

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Nachweis von *Aspergillus-fumigatus*-
Infektionen aus dem Respirationstrakt
mittels TaqMan-PCR**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von
Carola Scheer
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. M. Ruhnke

2.: Prof. Dr. med. H. Hof

3.: Prof. Dr. med. H. Einsele

Datum der Promotion: 16.01.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Vorkommen und Morphologie von <i>Aspergillus</i> -Spezies	5
1.2	<i>Aspergillus</i> -assoziierte Erkrankungen	6
1.3	Problematik der Diagnostik	7
1.4	Ziel und Fragestellung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Patientengut	11
2.1.1	Probenverteilung	11
2.1.2	Probenherkunft	11
2.1.3	Patientendaten	12
2.2	Labortechnischer Teil	15
2.2.1	Probenvorbereitung	15
2.2.2	DNS-Extraktion	15
2.2.3	Amplifikation der extrahierten DNS mittels konventioneller PCR	17
2.2.4	Detektion der Amplifikate mittels Gelelektrophorese	19
2.2.5	Sensitivität	19
2.2.6	Etablierung der real-time-PCR	20
2.2.6.1	Klonierung und Transformation	20
2.2.6.2	Plasmid-Isolierung	21
2.2.6.3	Erstellung der quantitativen Standardreihe	22
2.2.6.4	Funktionsprinzip der TaqMan-PCR	22
2.2.6.5	ABI Prism 7700 Sequence Detection System (7700 SDS)	24
2.2.6.6	Ansatz und Durchführung der TaqMan-PCR	25
2.3	Definition der invasiven Aspergillose	27
3	Ergebnisse	30
3.1	Patienteneinteilung	30
3.2	Molekularbiologische Verfahren	30
3.2.1	Entwicklung der DNS-Extraktion	30
3.2.2	Sensitivität	32
3.2.3	Spezifität der verwendeten Primer/Sonde	32

3.2.4	Entwicklung der TaqMan-PCR	34
3.2.4.1	Auswahl der TaqMan-Sonde	34
3.2.4.2	Thermocycler-Einstellungen	35
3.2.4.3	Die quantitative Standardreihe für die TaqMan-PCR	35
3.2.4.4	Detektion der Standardreihe	37
3.2.5	Testung verschiedener Materialien	38
3.2.6	Kontaminationsprophylaxe	38
3.3	Untersuchungen von Patientenmaterial	39
3.3.1	Untersuchungen im Vergleichskollektiv	39
3.3.2	Untersuchungen im Patientenkollektiv	39
3.3.2.1	Bewiesene invasive Aspergillose	40
3.3.2.2	Wahrscheinliche invasive Aspergillose	41
3.3.2.3	Mögliche invasive Aspergillose	41
3.3.2.4	Keine invasive Aspergillose	42
3.3.3	Panfungus-PCR	53
3.3.4	Darstellung einzelner Patienten im Verlauf	53
3.3.4.1	Patient Nr. 6 (KJ-40m)	53
3.3.4.2	Patient Nr. 1 (GH-80m)	53
3.4	Testvalidität/Resultatvalidität	56
3.4.1	Diagnostische Sensitivität	56
3.4.2	Diagnostische Spezifität	56
3.4.3	Positiver prädiktiver Wert	56
3.4.4	Negativer prädiktiver Wert	56
4	Diskussion	58
4.1	Patienteneinteilung	58
4.2	Molekularbiologische Diagnostik	59
4.2.1	DNS-Extraktionsverfahren	59
4.2.2	Sensitivität	60
4.2.3	TaqMan-PCR	61
4.2.4	Primer- und Sondenauswahl, Spezifität	62
4.2.5	Probenmaterial	63

4.3	Testvalidität/Resultatvalidität	63
4.4	Ausblick	65
5	Zusammenfassung	67
6	Reagenzienliste	69
7	Anhang	71
7.1	Danksagung	71
7.2	Konferenzbeiträge	72
7.3	Erklärung an Eides Statt	73
Literaturverzeichnis	74	

1 Einleitung

1.1 Vorkommen und Morphologie von *Aspergillus*-Spezies

Aspergillen sind in unserer Umwelt ubiquitär vorkommende Mikroorganismen, die zu den Schimmelpilzen gezählt werden. Schimmelpilze sind ein Sammelbegriff für Fadenpilze, die in Form von verzweigten Pilzfäden, sogenannten Hyphen, wachsen. Nach Verzweigung entsteht ein Geflecht, welches als Mycel bezeichnet wird. Pilzgeflechte sind oft mit dem bloßen Auge nicht erkennbar.

Bei den *Aspergillen* handelt es sich um Vertreter der thermotoleranten Schimmelpilze, das heißt (d. h.), sie gedeihen am besten bei erhöhten Temperaturen (bis über 40°C), weshalb sie besondere gesundheitliche Relevanz besitzen. Die wichtigsten humanpathogenen Arten sind *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* und *Aspergillus niger*, wobei *Aspergillus fumigatus* der am häufigsten nachgewiesene Erreger ist [1]. Er wurde das erste Mal im Jahr 1863 von Johann Baptist Georg Wolfgang Fresenius beschrieben [2]. Häufig in der Erde, z. B. Blumenerde oder Kompost vorkommend, wächst er bevorzugt auf organischem Abfall und sendet Tausende von Sporen in die Umgebung. Die Sporen messen einen Durchmesser von 2 bis 3µm, so dass sie problemlos in die Lungenalveolen gelangen können [3]. Untersuchungen haben ergeben, dass ein Mensch täglich neben mindestens 5.000 verschiedenen Sporenarten einige hundert *Aspergillus-fumigatus*-Sporen inhaliert [4]. Die Zusammenhänge zwischen Vorkommen der *Aspergillus*-Sporen und Auftreten von nosokomialen *Aspergillus*-Infektionen sind wiederholt mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht worden. Walsh [5] und Weems [6] et al. beschrieben in den 80er Jahren ein vermehrtes Auftreten von invasiven Aspergillosen in hämatologischen Abteilungen. Als Ursache wurde eine erhöhte *Aspergillus*-Sporen-Anzahl während Bauarbeiten innerhalb des Krankenhauses vermutet. Leenders et al. verglich 1999 [7] das Vorkommen von Pilzsporen innerhalb und außerhalb eines Krankenhauses. In den Untersuchungen konnte eine erhöhte Inzidenz der invasiven Aspergillose nicht mit dem erhöhten Vorkommen von *Aspergillus*-Sporen in der Umgebung erklärt werden. Dabei wurden die *Aspergillus-fumigatus*-Stämme der Patienten mit denen der Umgebung verglichen. Sie zeigten Unterschiede in der Genotypisierung, so dass Leenders et al. vermutete, dass der Patient bei Betreten des Krankenhauses den Pilz „mitbringt“. Curtis et al. [8] überprüfte die Konzentration an *Aspergillen* in einem Krankenhaus. Erhöhte Konzentrationen ließen sich während Renovierungsarbeiten, nach fehlerhaften Dacharbeiten, in einem Raum mit leckender Rohrleitung und in einem Raum mit vermehrter Kondenswasserbildung messen.

Für eine Person mit einem intakten Immunsystem stellen die humanpathogenen *Aspergillus*-Sporen in der Regel keine Gefahr dar, da sie durch das Immunsystem abgewehrt werden. Immungeschwächte Personen können jedoch an verschiedenen Manifestationsformen erkranken [1], (Kapitel 1.2).

1.2 *Aspergillus*-assoziierte Erkrankungen

Durch *Aspergillus*-Spezies verursachte Erkrankungen variieren von lokaler Besiedlung an Haut und Schleimhäuten, allergischen Reaktionen bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen. *Aspergillus*-Infektionen werden überwiegend durch *Aspergillus fumigatus* [1], seltener durch *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* oder durch *Aspergillus terreus* hervorgerufen. Die häufigste Eintrittspforte stellen die Atemwege dar. Nach Aufnahme kommt es zur Ansiedlung der Sporen im Respirationstrakt. In einem gesunden Organismus werden sie durch das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen eliminiert. Im Falle eines geschwächten Immunsystems mit unzureichender Keimabwehr kommt es zur Mycelbildung, im weiteren Verlauf zur Ausbildung von Fruchtkörpern mit Ausbildung von Sporen und damit zur weiteren Vermehrung und Verbreitung. Der Verlauf wird maßgeblich durch die Kompetenz des Immunsystems bestimmt [9,10,11]. Verschiedene invasive Manifestationsformen der Aspergillose können unterschieden werden [1,12]:

1. Akute invasive pulmonale Aspergillose:

Die akute Form kann unter dem Bild einer Pneumonie einen fulminanten Verlauf nehmen und vor allem bei immunsupprimierten Patienten innerhalb kürzester Zeit zum Tod führen. Bei 25 bis 33% der Patienten können initiale Symptome wie Husten und Fieber fehlen [1] und erst bei fortgeschrittener Erkrankung auftreten. Als schwerste Erkrankungsform tritt sie in Form der disseminierten invasiven Aspergillose auf.

2. Chronische invasive Aspergillose:

Sie ist seltener als die akute Form und tritt unter anderem bei Patienten mit AIDS (acquired immunodeficiency syndrome), chronischer Granulomatose [13,14] sowie nach länger andauernder Therapie mit Kortikosteroiden wie bei Sarkoidose [15] auf. Symptome wie Husten, Hämoptysen, aber auch Fieber, können Wochen bis Monate bestehen.

3. *Aspergillus* Tracheobronchitis:

Sie tritt vorrangig bei AIDS- und lungentransplantierten Patienten [16,17] auf. Die milde Form äußert sich mit vermehrter Schleimproduktion und lokaler Entzündung. Vor allem nach Lungentransplantation werden schwerere Verläufe mit Ulzerationen und Ausbildung von Pseudomembranen beschrieben [18].

4. Zerebrale Aspergillose:

In 10 bis 20% aller Fälle einer invasiven Aspergillose liegt eine zerebrale Manifestation vor [1]. Eine klinische Symptomatik tritt erst spät auf. Dabei äußern weniger immunsupprimierte Patienten lokale Beschwerden z. B. Kopfschmerzen. Die Symptome stärker immunsupprimierter Patienten sind unspezifisch und können sich z. B. in mentalen Defiziten äußern.

5. Invasive *Aspergillus* Sinusitis:

Die akute Rhinosinusitis kann sich in Patienten nach Knochenmarktransplantation und in neutropenischen Patienten manifestieren [19]. Sie äußert sich zunächst unspezifisch mit Fieber, Husten und Nasenbluten. Sie kann parallel zu einer pulmonalen Aspergillose auftreten. Die chronische Form betrifft eher Patienten mit einem nicht geschwächten Immunsystem [20]. Die Symptomatik variiert je nach Progress der Erkrankung und kann sich in visuellen Problemen und Kopfschmerzen äußern.

6. Disseminierte Aspergillose:

Sie ist die schwerste Erkrankungsform der invasiven Aspergillose mit hoher Mortalität, bei der es zur systemischen Ausbreitung des Erregers mit Absiedlung in weitere Organe kommt [21]. Davon sind vor allem die Leber, Milz, Haut sowie das zentrale Nervensystem betroffen.

In den letzten 20 Jahren ist die Prävalenz invasiver Mykosen von 2,2% auf 5,1% gestiegen [22]. Wald et al. [23] berichtet 1997 über ein Ansteigen der Inzidenz der invasiven Aspergillose bei knochenmarktransplantierten Patienten von 5,7% auf 11,2%. Zu über 90% ist der *Aspergillus fumigatus* der verursachende Keim einer invasiven Aspergillose [3,1]. Die erhöhte Inzidenz ist vermutlich auf eine steigende Zahl von Patienten mit geschwächter Immunkompetenz zurückzuführen. Zu erwähnen sind die zunehmenden Eingriffe mit begleitender immunsuppressiver Therapie wie z. B. Knochenmark- und Stammzelltransplantationen [24], die Transplantation solider Organe [25] sowie der steigende Gebrauch von Breitbandantibiotika und Zytostatika im Rahmen maligner Erkrankungen [26].

Trotz antimykotischer Therapie wird weiterhin eine hohe Mortalität im Zusammenhang mit der invasiven Aspergillose beschrieben. Sie beträgt für die invasive pulmonale Aspergillose fast 75%, bei zerebralem Befall liegt sie bei mehr als 95% [1]. Die invasive Aspergillose ist eine der Haupttodesursachen unter Patienten nach durchgeführter Hochdosis-Chemotherapie sowie nach Knochenmark-, Stammzell-, oder Organtransplantation [3]. Einsele et al. [27] untersuchte 1998 mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) bronchoalveoläre Lavagen und konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Nachweis von *Aspergillus*-DNS vor einer Knochenmarktransplantation und der Erkrankung an einer invasiven Aspergillose nach der Transplantation beobachten. Eine vorbestehende Kolonisation mit *Aspergillus*-Spezies könnte somit als ein zusätzlicher Risikofaktor für die Entwicklung einer invasiven Aspergillose betrachtet werden.

1.3 Problematik der Diagnostik

Aufgrund des vielfältigen Erscheinungsbildes und der wechselnden unspezifischen klinischen Symptome, gestaltet sich die Diagnose der invasiven Aspergillose sehr schwierig. Gerade bei immunsupprimierten Patienten kann eine starke Diskrepanz zwischen einer eher milden Symptomatik bei bereits fortgeschrittener Infektion beobachtet werden [1]. Bei der körperlichen Untersuchung können die Zeichen einer Pneumonie auch ganz fehlen [28]. Durch die vielseitige Symptomatik ist die invasive Aspergillose nicht von bakteriellen oder viralen Infektionen zu unterscheiden. Bei Auftreten von Fieber in der Neutropenie und pulmonalen Infiltraten, sollte an die Möglichkeit einer invasiven Mykose gedacht und eine schnelle Diagnostik eingeleitet werden. Schon Ende der 70er Jahre wird die Wichtigkeit einer frühzeitigen Diagnose und die schnelle Einleitung einer antimykotischen Therapie postuliert

[29]. Kontoyiannis [30] und Caillot [31] et al. beobachteten 2002 und 1997 eine höhere Überlebensrate bei Einleitung einer frühzeitigen Therapie. Maschmeyer et al. [32] beobachtete 1994 fast 300 Patienten in der Neutropenie mit malignen hämatologischen Erkrankungen. Bei Auftreten von Fieber oder pulmonalen Infiltraten wurde eine antimikrobielle Therapie eingeleitet. Dabei wurde eine Ansprechrate von 27,1% auf eine isolierte antibiotische Therapie beobachtet, die nach Erweiterung um ein Antimykotikum auf 61,3% anstieg.

Wie das klinische Bild, so sind auch die pathologischen Veränderungen im konventionellen Röntgenbild unspezifisch und vielseitig. Manchmal können noduläre unscharfe Herde zu erkennen sein [33]. In der Frühphase ist das Röntgenbild jedoch meistens unauffällig [34]. In der Computertomographie können sich bei Patienten in der Neutropenie sehr früh meist pleuranah gelegene Noduli abzeichnen, die den Veränderungen des konventionellen Röntgenbildes vorausgehen [12,31]. Diese computertomographischen Veränderungen können sich im Verlauf wie folgt darstellen [34,35,36]:

- Als „halo-sign“, einem unscharfen Randsaum („milchglasartige“ Trübung), entsprechend einem ischämischen Areal oder Blutung,
- im weiteren Verlauf als „air-crescent-sign“, entsprechend einer Luftsichel in der Peripherie eines Lungenherdes, entsteht im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf durch Organisation infarzierten Gewebes
- sowie letztendlich als Einschmelzung innerhalb einer Lungenparenchym-konsolidierung.

Trotz der besseren Sensitivität der Computertomographien gegenüber den Röntgenaufnahmen, zeigen sich ihre Grenzen in der Schwierigkeit der diagnostischen Interpretation. Eine nähere Identifizierung des Erregers ist durch die Bildgebung nicht möglich.

Die spezifische Charakterisierung des Erregers kann mikroskopisch durch Begutachtung von gefärbten Ausstrichen sowie kulturell durch die Anzüchtung des Erregers auf speziellen Nährmedien aus Sputum, Trachealsekret, Bronchiallavage, Pleurapunktat, Liquor und anderen Präparaten erfolgen. Problematisch ist die Bewertung von angelegten Kulturen. Kontaminationen durch ubiquitär vorkommende *Aspergillus*-Sporen, aber auch ausbleibendes Wachstum werden beschrieben [37,38]. Bei positiven Befunden kann oft zwischen Kontamination des Materials, Kolonisation oder Infektion des Patienten, insbesondere bei fehlenden anderen diagnostischen Hinweisen, nicht eindeutig entschieden werden. Die genaue Differenzierung innerhalb der *Aspergillus*-Spezies ist nicht immer möglich. Erste Ergebnisse sind erst nach ungefähr zwei bis drei Tagen zu erwarten. Blutkulturen hingegen bleiben fast immer negativ [39,40]. Eine invasive Aspergillose gilt als bewiesen, wenn der histopathologische oder zytopathologische Nachweis von Hyphen aus einer Biopsie oder Feinnadelaspiration oder wenn der kulturelle Nachweis von *Aspergillus* aus steril gewonnenem Material gelingt.

Verschiedene serologische Verfahren existieren für die Diagnostik einer invasiven Aspergillose, darunter der Nachweis von zirkulierendem Galaktomannan, einem Polysaccharid-Antigen der *Aspergillus*-Zellwand, welches während der Ausbreitung des Erregers im Gewebe in den Blutkreislauf gelangt. Die am häufigsten angewendeten Methoden sind der Latex-Agglutinationstest und der „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA), wobei der ELISA mit 1ng/ml eine bessere Sensitivität als der Latex-Test mit 25ng/ml aufweist [1]. Der Nachweis positiver Werte vor dem Auftreten klinischer Symptome aus dem Serum [41] ist möglich. Die Spezifität des Erregernachweises wird durch das Auftreten von Kreuzreaktionen unter anderem mit *Penicillium*-Spezies, geschmälert [42,43]. Die Angaben über die diagnostische Sensitivität des ELISA variieren stark. Während Herbrecht

et al. [44] über eine Sensitivität von teilweise unter 30% berichtet, liegt sie nach Musher et al. bei 61% [45] und nach Becker et al. bei 100% [46].

Eine weitere – die modernste – Methode zum Nachweis von Krankheitserregern kommt aus dem Bereich der Molekularbiologie. Das Verfahren zur Vervielfältigung kleinster Desoxyribonukleinsäure-Fragmente (DNS-Fragmente), die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1983 von Kary Mullis erfunden. 1993 erhielt er dafür den Nobelpreis. Durch die Auswahl definierter Primer können Genabschnitte durch enzymatische Replikation amplifiziert werden, die in verschiedenen Pilzspezies vorkommen [47, 48, 49, 50] oder die für *Aspergillen* spezifisch sind [51, 52, 53]. Eine weitere Differenzierung innerhalb der *Aspergillus*-Spezies kann zum Beispiel durch anschließende Hybridisierung mit spezifischen Sonden (PCR-ELISA, Blotting-Tests) oder durch die Methode der Restriktionsanalyse („restriction fragment polymorphism“, RFLP) erfolgen. Dafür sind zusätzliche Arbeitsschritte wie beispielsweise Inkubation, Waschvorgänge oder eine gelelektrophoretische Auftrennung erforderlich. Neben dem hohen Arbeits- und Zeitaufwand bergen diese Verfahren eine hohe Gefahr der Carry-over-Kontamination.

1993 wurde von Lee [54] mit Hilfe des Einsatzes einer fluorogenen Oligonukleotid-Sonde die real-time-PCR entwickelt. Diese Sonde bindet zunächst mit den Primern innerhalb der amplifizierten Gensequenz. Im Verlauf der PCR kann bei Sondenhydrolyse eine Fluoreszenz gemessen werden, die sich proportional zur Menge des eingesetzten Ausgangsproduktes verhält. Durch Anwendung dieses sogenannten real-time-PCR-Assays kann somit eine quantitative Aussage über das amplifizierte PCR-Produkt gemacht werden. Zusätzlich werden die Arbeitsschritte der Amplifikation und der folgenden Detektion in einem Schritt zusammengefasst. Zur Durchführung der real-time-PCR steht entweder der LightCycler (Roche Diagnostics) oder das in der vorliegenden Arbeit angewendete ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin Elmer, Applied Biosystems) zur Verfügung.

Problematisch gestaltet sich die Vorbereitung des PCR-Produktes, die Extraktion der *Aspergillus*-DNS. Pilze, darunter die *Aspergillus*-Spezies besitzen im Gegensatz zu Bakterien eine Zellwand aus Polysacchariden wie Chitin, Glukan und Mannan, die sich als sehr resistent gegenüber der enzymatischen Lyse erwiesen hat [55]. Zusätzliche chemische Versuche, die Wand zu durchbrechen [50] sowie die Zerstörung durch physikalische Kräfte [48,56] werden beschrieben. Kommerzielle Tests (Qiagen, Fast Prep) werden vermehrt mit unterschiedlichen Ergebnissen eingesetzt [55].

1.4 Ziel und Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung einer sensitiven und spezifischen Methode, mit der der Nachweis von *Aspergillus fumigatus* innerhalb weniger Stunden möglich ist. Um das zu erreichen, wird der Frage nachgegangen, ob durch die Anwendung einer kommerziellen Extraktionsmethode auf mechanischer Basis, *Aspergillus-fumigatus*-DNS aus Bronchiallavagen (BAL) und anderen Materialien schnell und zuverlässig nachgewiesen werden kann.

Die anschließende Amplifikation und Detektion der extrahierten DNS soll durch die Etablierung einer quantitativen real-time-PCR (TaqMan-PCR) erfolgen. Die Frage ist, ob sich Primer mit einer passenden fluoreszenzmarkierten Sonde entwickeln lassen, die spezifisch *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachweisen können.

Zur Überprüfung der Methode wird die Spezifität durch den Einsatz verschiedener Pilzstämme und die Sensitivität an Hand von Verdünnungsreihen ermittelt.

Die Methode wird an Hand einer prospektiven Untersuchung von Patientenmaterial von 204 Patienten klinisch evaluiert und validiert.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengut

2.1.1 Probenverteilung

Über einen Zeitraum von drei Jahren (06/1998 bis 06/2001) werden prospektiv insgesamt 269 Proben von 204 Patienten bearbeitet. Es handelt sich zu 83,6% um Proben aus dem Respirationstrakt, darunter befinden sich 212 Bronchiallavagen (BAL) elf Trachealsekrete und zwei Bronchialsekrete. Zusätzlich werden 14 Pleuraerguss-Punktate, 13 Liquorproben, sowie zehn Biopsate untersucht (sieben Lungenbiopsate, ein Leberbiopsat, ein Magenbiopsat und ein Bulbus-oculi-Biopsat). Unter die Rubrik „Sonstige“ fallen weitere sieben Proben, die sich wie folgt aufschlüsseln: Ein Aszitespunktat, zwei Hornhaut-Abradate, zwei Kammerwasser-Punktate, ein Pankreassekret und ein Perikarderguss-Punktat (Abbildung 1).

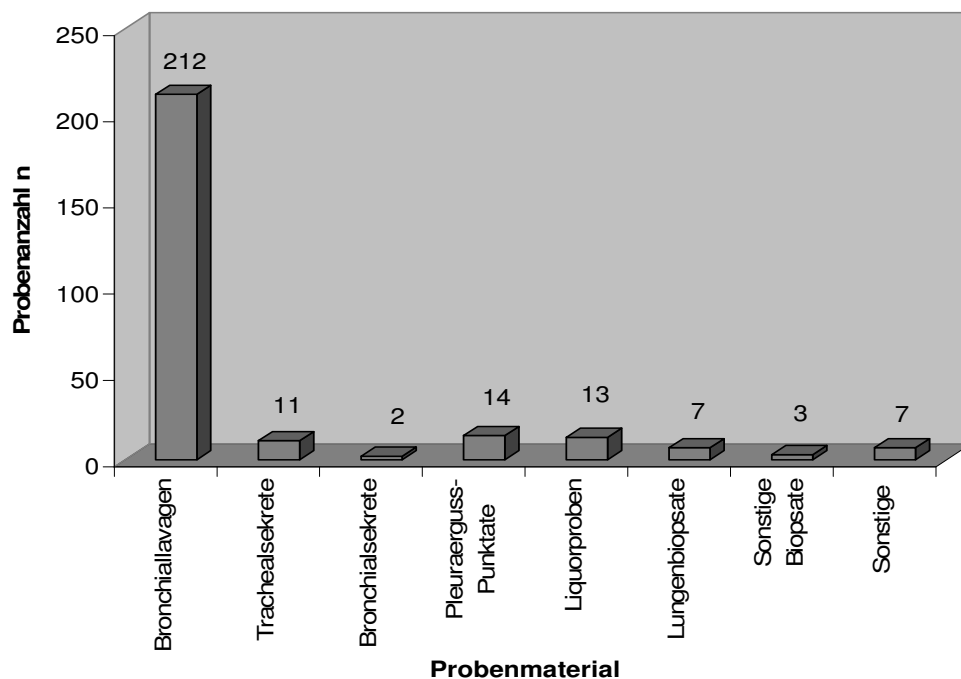


Abbildung 1: Probenverteilung innerhalb des untersuchten Patienten- und Vergleichskollektivs (Probenanzahl n=269), Sonstige Biopsate: **Bulbus oculi** (n=1), **Leber** (n=1), **Magen** (n=1); Sonstige: **Aszites** (n=1), **Hornhaut-Abradat** (n=2), **Kammerwasser-Punktat** (n=2), **Perikarderguss-Punktat** (n=1), **Pankreassekret** (n=1).

2.1.2 Probenherkunft

Die überwiegende Anzahl der Proben (62,1%, n=167) werden über die hämatologischen/onkologischen Abteilungen der Charité Berlin (Standort Charité Virchow-Klinikum n=120, Benjamin Franklin n=16, Berlin-Buch n=31) bezogen. Ein kleinerer Anteil der Proben, 11,5% entstammen dem Universitäts-Klinikum Eppendorf, Hamburg (n=31). Insgesamt 71 BAL-Proben (26,4%) lassen sich aus der Lungenfachklinik Heckeshorn (Zentralklinik Emil-von-Behring, Berlin) von primär pulmonologischen Patienten heranziehen. Sie werden als sogenanntes Vergleichskollektiv betrachtet.

2.1.3 Patientendaten

Die hier betrachteten Patienten weisen einen Alterdurchschnitt (arithmetischen Mittelwert) von 53,3 Jahren auf. Der Median liegt bei 54 Jahren. Das Alter des jüngsten Patienten beträgt elf Jahre, das des ältesten 86 Jahre. Die Geschlechterverteilung differiert mit 130 Männern zu 74 Frauen.

Vergleichskollektiv:

Von den 204 Patienten werden die 67 Patienten (71 Proben) der Lungenfachklinik einem so genannten Vergleichskollektiv zugeordnet. Es handelt sich hierbei um Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen, die keine hämatologische Grunderkrankung aufweisen. Mit abnehmender Häufigkeit leiden 21 von ihnen hauptdiagnostisch unter einer meist bakteriellen Pneumonie. Neben zwölf Sarkoidose-Erkrankten, sind zehn am Bronchial-Karzinom (Bronchial-Ca) erkrankt. Sechs Patienten leiden an chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COLD), darunter befindet sich ein Asthmatiker. Weitere fünf sind an Tuberkulose (TBC) erkrankt. Die übrigen 13 Patienten werden mit verschiedenen Hauptdiagnosen unter „Sonstige“ zusammengefasst. Eine Übersicht bietet die Abbildung 2. Ein Patient weist zum Zeitpunkt der Probenabnahme eine Neutropenie nach Chemotherapie auf.

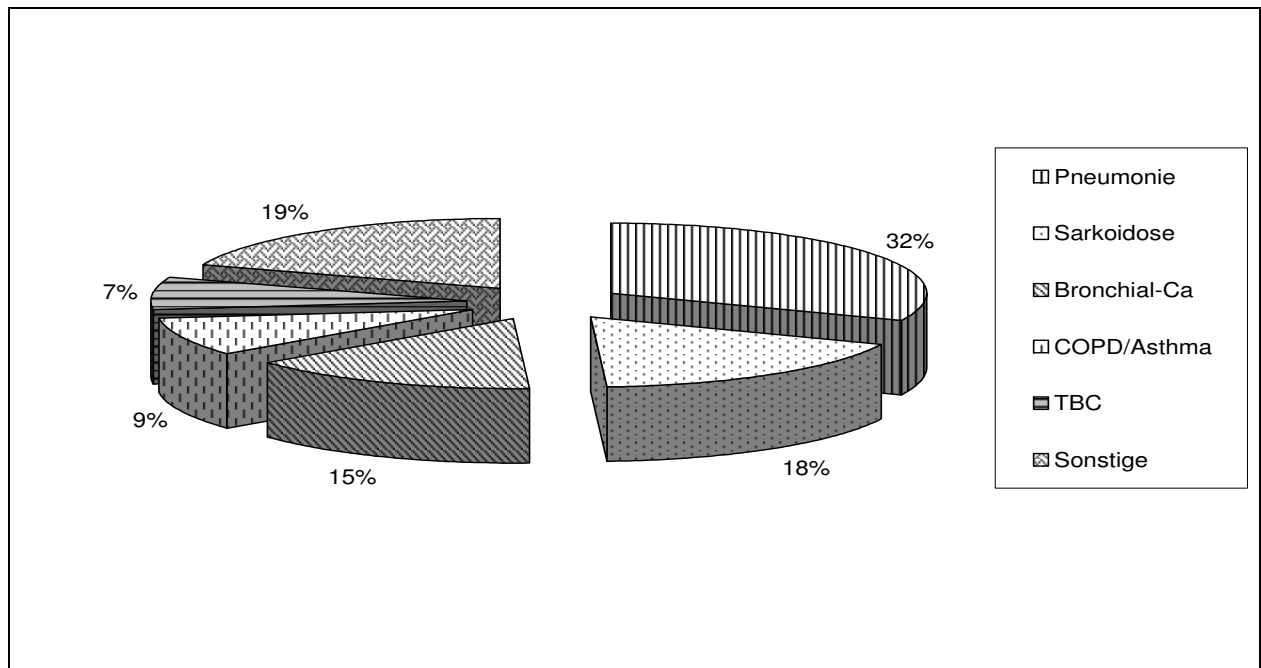


Abbildung 2: Diagnosenverteilung innerhalb der Vergleichsgruppe, Angaben in Prozent, in absteigender Reihenfolge: **Pneumonie** (n=21), **Sarkoidose** (n=12), **Bronchial-Ca** (n=10), **COPD/Asthma** (n=6), **TBC** (n=5), **Sonstige** (n=13), darunter: **Lungenfibrose** (n=4), **Alveolitis** (n=3), **HIV** (n=2), **Bronchiolitis obliterans** (n=1), **Histiozytom** (n=1), **Lungenarterienembolie** (n=1), **Pleuraempyem** (n=1), n=Anzahl

HIV = Human Immunodeficiency Virus

Patientenkollektiv:

Die Grunderkrankungen der 137 Patienten der Hauptgruppe setzen sich zu 85% aus hämatologischen Erkrankungen zusammen, darunter führend die akute myeloische Leukämie (AML n=59), gefolgt von den Lymphomen (n=25), die sich in 22 Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und drei Hodgkin-Lymphome (Morbus Hodgkin = M. Hodgkin) aufteilen. Weitere acht Patienten weisen einen soliden malignen Tumor (vorrangig das Bronchial-Ca) vor. Sechs Patienten leiden unter einem Plasmozytom. 21 Patienten können nicht den hämatologischen/onkologischen Gruppierungen zugeordnet werden. Sie leiden entweder unter einer schweren systemischen Infektion oder weisen bei verschiedenen Grunderkrankungen eine anhaltende Neutropenie vor. Die genaue Zusammensetzung sind den Abbildung 3 und Abbildung 4 zu entnehmen.

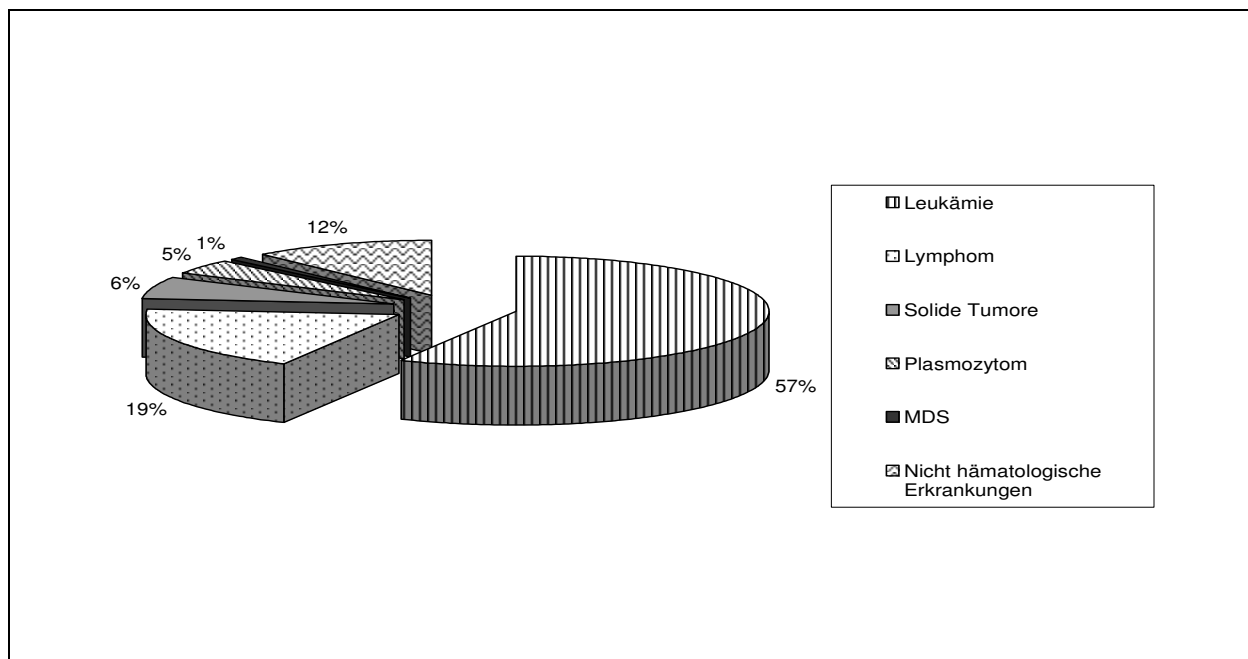


Abbildung 3 : Kreisdiagramm zur Verteilung der Grunderkrankungen innerhalb des Patientenkollektivs (n=137), Angaben in Prozent. MDS = Myelodysplastisches Syndrom

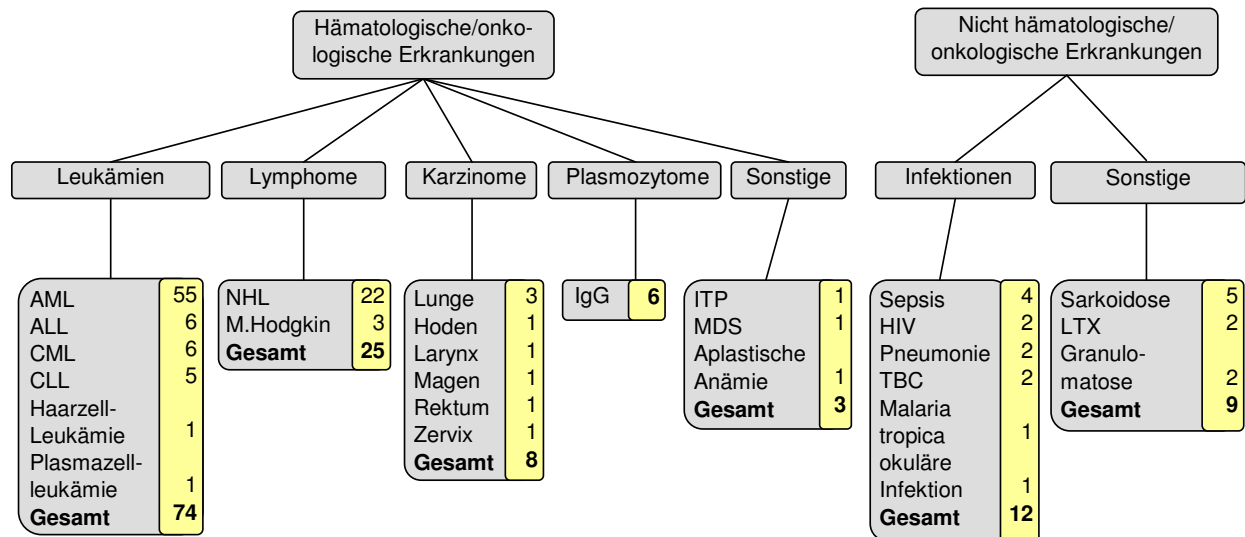


Abbildung 4: Flussdiagramm zur detaillierten Ansicht der Hauptdiagnosen im Patientenkollektiv. Die Zahlen geben die Anzahl (n) der Patienten an, die an den jeweiligen Erkrankungen leiden:

AML	=	akute myeloische Leukämie
ALL	=	akute lymphatische Leukämie
CML	=	chronische myeloische Leukämie
CLL	=	chronische lymphatische Leukämie
NHL	=	Non-Hodgkin-Lymphom
IgG	=	Immunglobulin G
ITP	=	Idiopathisch thrombozytopenische Purpura
MDS	=	Myelodysplastisches Syndrom
HIV	=	Human Immunodeficiency Virus
TBC	=	Tuberkulose
LTX	=	Lebertransplantation

2.2 Labortechnischer Teil

Eine detaillierte Reagenzienliste befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Kapitel 6).

2.2.1 Probenvorbereitung

Sämtliche Proben werden direkt nach Entnahme ins Labor gesandt und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Zuvor werden 100 μl von hausinternen Bronchiallavagen auf einer Sabouraud-Agar-Platte (SAB-Agar) ausplattiert, 24 Stunden bei 35°C und danach bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.2 DNS-Extraktion

Die Proben werden zu Beginn langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Das eingesetzte Probenvolumen beträgt je 1ml. Erythrozytenreiche Proben erfahren zunächst eine zweimalige Vorbehandlung mit einem hypotonen Red Cell Lysis Buffer (RCLB). Nach Zugabe von 1ml RCLB zu 1ml Probenmaterial wird das Gemisch 10min im Überkopfschüttler geschwenkt (GFL 3025). Biopsate werden bis auf 2ml mit oben genannten RCLB versetzt und weiter behandelt wie die übrigen Proben. Nach der anschließend folgenden zehnminütigen Zentrifugation bei 3.000rpm (Heraeus Sepatech Varifuge RF) entsteht ein Pellet, welches nach Entfernung des Überstandes erneut in 2ml RCLB resuspendiert und unter den oben angegebenen Bedingungen geschwenkt sowie zentrifugiert wird.

Nach erneutem Entfernen des Überstandes können die vorbehandelten anfänglich erythrozytenreichen Proben gemeinsam mit dem erythrozytenarmen Material extrahiert werden. Für die nun folgende enzymatische Lyse der Leukozyten wird 1ml des noch nicht vorbehandelten Materials mit 1ml eines White Cell Lysis Buffers (WCLB) versetzt. Die übrigen Proben, Biopsate, sowie mit RCLB vorbehandelte Proben werden mit WCLB bis auf ein Volumen von 2ml aufgefüllt. Als Negativkontrolle dient 1ml einer physiologischen Kochsalzlösung, anstelle des Probenmaterials. Die Positivkontrolle stellt eine mit *Aspergillus fumigatus* (DSM 790, DSM 819 oder DSM 63359) gespickte physiologische NaCl-Lösung dar. Der Stamm wird zuvor in einer Sabouraud-Agar-Flüssigkultur als Reinkultur angelegt. Die Proben werden nun für 1h bei 65°C inkubiert (Thermomixer 5463, Eppendorf) und anschließend 5min bei 13.000rpm zentrifugiert.

An dieser Stelle werden die Proben nach zwei verschiedenen Verfahren weiter bearbeitet. Als Vergleich zum enzymatisch-mechanischem Verfahren wird zunächst ein enzymatisch-chemisches Extraktionsverfahren durchgeführt.

Extraktions-Methode 1 (enzymatisch-chemisch):

Der gesamte Überstand wird nach der fünfminütigen Zentrifugation dekantiert. Anschließend erfolgt die chemische Lyse der Pilzzellen durch Zugabe von 100 μl NaOH-Lösung, verbunden mit einer zehnminütigen Inkubation bei 95°C in einem Heizblock. Zum Kondensationsschutz werden die Proben mit vier Tropfen Mineralöl überschichtet. Nach Entfernen der Ölschicht erfolgt eine fünfminütige Zentrifugation bei 3.000rpm. Nach Dekantieren des Überstandes wird 100 μl Zymolase-Reagenz zugegeben. Es erfolgt eine 30minütige Inkubation im Wasserbad bei 37°C . Anschließend werden 10 μl SDS-Lösung (10%) und 150 μl Magnetbeads (Dynabeads) zugefügt. Das Gemisch wird für 15min bei 65°C und anschließend für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Jetzt erfolgt die biomagnetische Isolation der Nukleinsäuren durch Einsatz einer flexiblen Magnetschiene. Die Schiene gehört zu einem Ständer, in den das Reaktionsgefäß gesetzt wird. Nach 2min wird die Flüssigkeit vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wird durch die Magnetkraft an der Innenwand des Gefäßes gehalten. Nach Entfernung der Magnetschiene wird das Pellet mit

200µl Waschpuffer resuspendiert. Nach erneutem Einsetzen der Magnetschiene wird der Vorgang wiederholt. Das entstehende Pellet wird mit 30µl TBE-Puffer versetzt und 30min bei Raumtemperatur belassen. Die Produkte werden bei 4°C gelagert.

Extraktionsmethode 2 (enzymatisch-mechanisch):

Nach Zentrifugation werden 800µl des Überstandes verworfen. Nach der enzymatischen Lyse erfolgt die zusätzliche mechanische Behandlung im FastPrep cell disrupter. Dafür wird der Fast DNA-Kit (Qbiogene, Illkirch, France, No. 6540-400) eingesetzt. Die verbleibenden 1,2ml werden in die im Kit enthaltenen Reaktionsgefäße überführt. Die Reaktionsgefäße enthalten eine Lysing Matrix bestehend aus „Ceramic Spheres (1/4“) und Garnet“ (Kugel und Körner), welche die mechanische Zerstörung der Zellen im Fast Prep cell disrupter unterstützen (Abbildung 5).

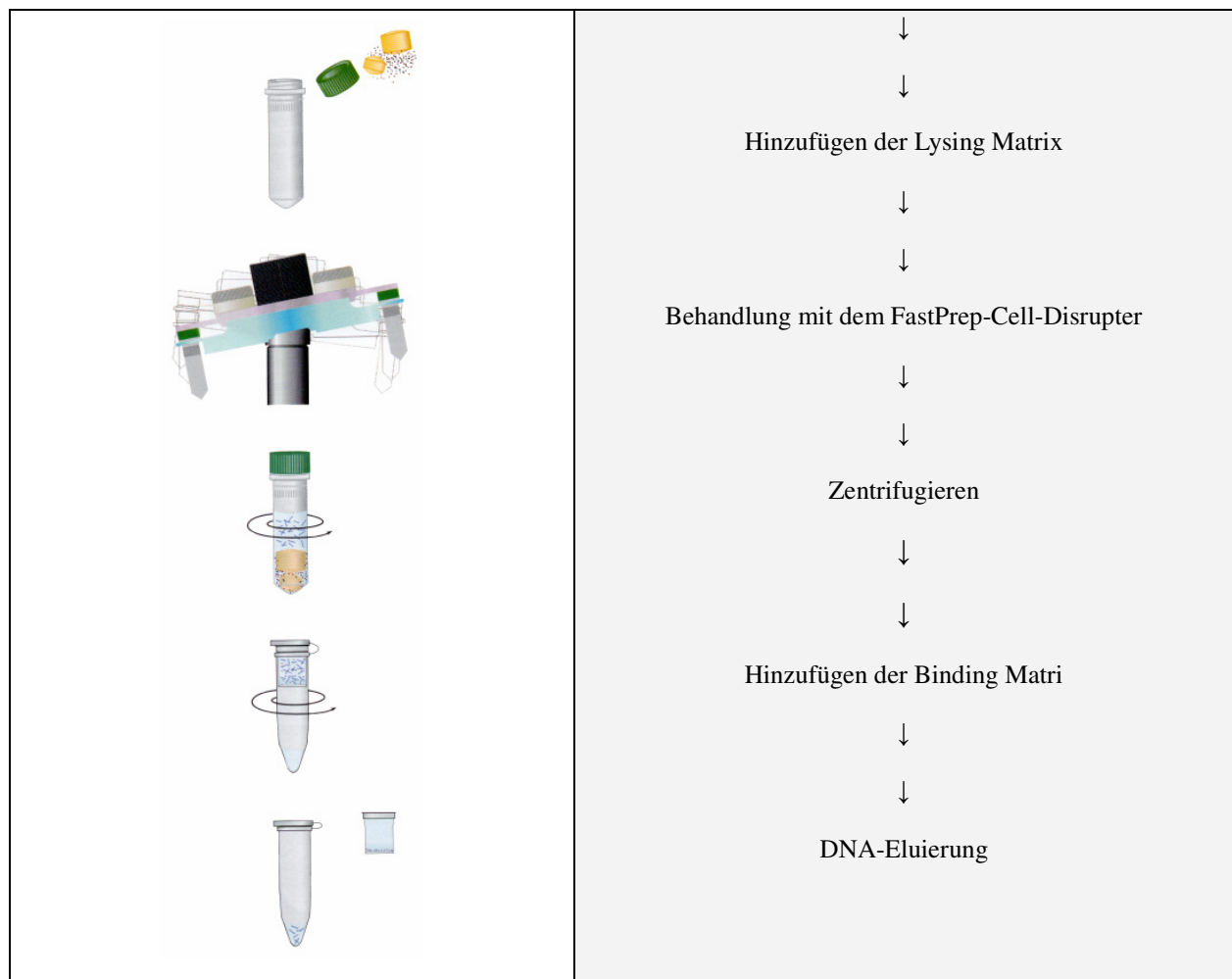


Abbildung 5 : Mechanismus des Fast Prep FP120 cell disrupter, Qbiogene, Movers & Shakers: Mechanismus des Fast Prep FP120 cell disrupter, Qbiogene, Movers & Shakers

Die Reaktionsgefäße inklusive Überstand und der Lysing-Matrix werden dreimal im FastPrep FP 120 cell disrupter (Qbiogene, Illkirch, France) bei einer Geschwindigkeit von 5,5m/s jeweils 30s mechanisch behandelt. Der „cell disrupter“ erzeugt schnelle Bewegungen in allen drei Dimensionen und überträgt diese auf die darin befestigten Reaktionsgefäße. Die durch die Bewegung der Lysing Matrix entstehenden Scherkräfte sollen eine Aufspaltung der *Aspergillus*-Zellwände bewirken. Um der entstehenden Reibungswärme entgegen zu wirken, werden die Proben

zwischen den einzelnen Durchgängen für circa (ca.) 30s auf Eis gelagert. Nach dem dritten Durchgang werden die Proben 15min lang bei 13.000rpm zentrifugiert. 600µl des Überstandes werden in neue Reaktionsgefäße (1,5ml, Eppendorf 0030 120.086) überführt und ebenfalls mit 600µl einer dem FastPrep-Kit zugehörigen Glasmilch (Binding Matrix) versetzt. Das Gemisch wird durch vorsichtiges Umdrehen der Reaktionsgefäße vermengt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Einer anschließenden Zentrifugation für 2min bei 13.000rpm, folgt die Entfernung des Überstandes. Die zurückbleibenden Pellets werden in 500µl 70% Ethanol resuspendiert und zweimal für 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Nach jedem Durchgang wird der Überstand entfernt. Anschließend werden die Pellets in 100µl TBE-Puffer resuspendiert und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der nun folgenden zweimaligen Zentrifugation für 2min bei 13.000rpm wird der die DNS enthaltene Überstand, nach jedem der beiden Durchgänge in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben werden bis zur Durchführung der PCR bei 4°C gelagert.

2.2.3 Amplifikation der extrahierten DNS mittels konventioneller PCR

Das Grundprinzip der PCR beruht auf einer exponentiellen Vermehrung einer bestimmten Sequenz im Genom. Das zuvor extrahierte DNS-Stück, das die gesuchte Sequenz enthält, dient als Matrize. Die zunächst durchgeführte PCR erfolgt mit einem Primerpaar, welches Genabschnitte amplifiziert, die bei verschiedenen Pilzspezies vorliegen. Diese Vorversuche sollen gewährleisten, dass die in der vorliegenden Arbeit angewendete Extraktionsmethode viele verschiedene Pilzspezies erfasst. Die Sequenzen der sogenannten Panfungus-Primer lauten wie folgt:

Primer 1: 5'- ATT GGA GGG CAA CTG TGG TG - 3' 20mer

Primer 2: 5'- CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG - 3' 20mer

Nach Durchführung einer PCR nach unten angegebenem Schema, erfolgt die Durchführung einer weiteren PCR mit *Aspergillus-fumigatus*-spezifischen Primern. Aufgrund der bekannten Sequenz wird über die Gendatenbank ein aus Oligonukleotiden bestehendes Primerpaar ermittelt (Genbank accession number: AF 22238):

Primer 1: 5'- CCA GCT CAG CCG GAT TTA TAC C- 3' 22-mer

Primer 2: 5'- CAT GGT TGA GCT TAG CCA GGA AC- 3' 23-mer

Mit diesem Primerpaar wird eine 212 Basenpaare (bp) lange Sequenz aus dem *Aspergillus-fumigatus*-Genom herausgefiltert. In diesem Fragment liegt eine Zielsequenz, an der später im Rahmen der TaqMan-PCR eine Sonde (Genbank accession number: AF 22238) ansetzen soll.

Zur Durchführung der PCR wird zunächst ein sogenannter Mastermix hergestellt, der sich aus den in Tabelle 1 aufgelisteten Reagenzien zusammensetzt. Davon werden 48µl je Probe eingesetzt. Je PCR-Durchlauf werden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mit eingeplant.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mastermix für beide Primerpaare je Probe, Gesamtvolumen 48 µl/Probe, UV-Licht: ultraviolettes Licht

Volumen in µl	Reagenz	Hersteller
34,75	Aqua ad injectabilis	Braun
5,00	PCR-Puffer (10mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8,3, Konzentration 10x)	Perkin Elmer
2,00	MgCl ₂ (25mM)	Sigma
4,00	dNTP (ATP, CTP, GTP, TTP á 2,5mM)	BRL
1,00	Primer 1 (20µM)	TIB MOLBIOL
1,00	Primer 2 (20µM)	TIB MOLBIOL
Vor Hinzufügen der Taq-Polymerase wird der Mix für 13min mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt (UV Stratalinker 2400, Stratagene).		
0,25	Taq-Polymerase (5U/µl)	Perkin Elmer

Nach Hinzufügen der Taq-Polymerase wird der angesetzte Mix auf Microtubes (500 µl, Sarstedt, Nümbrecht) verteilt. Abschließend erfolgt die Zugabe des Extraktionsprodukts bis zum Erreichen des Gesamtvolumens von 50 µl (2 µl von jeder Probe). Als Positivkontrolle dient ein bekanntes, reproduzierbares *Aspergillus-fumigatus*-Extraktionsprodukt, die Negativkontrolle erhält keinen weiteren Zusatz. Vor Verschließen der Microtubes werden die für die PCR fertigen Ausgangsprodukte mit einem Tropfen Mineralöl versetzt. Sämtliche Arbeitsschritte werden unter der Lamin Air Abzugsbank (HBB 2448, Haereus) durchgeführt.

Die PCR-Produkte durchlaufen, je nach eingesetztem Primerpaar, im Thermocycler (Trio-Thermoblock, Biometra) die in den Tabelle 2 und Tabelle 3 angegebenen Programme und werden anschließend bei 4°C gelagert.

Tabelle 2: PCR-Programm für die *Aspergillus-fumigatus*-spezifischen Primer

50°C	10	min	
94°C	10	min	
94°C	30	s	}
62°C	1	min	} 35 Zyklen
65°C	1	min	}
72°C	10	min	
4°C	∞		

Tabelle 3: PCR-Programm für die Panfungus-Primer

95°C	5	min	
95°C	30	s	}
62°C	1	min	} 35 Zyklen
72°	2	min	}
72°C	5	min	
4°C	∞		

2.2.4 Detektion der Amplifikate mittels Gelelektrophorese

Der Nachweis der amplifizierten DNS erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hier erfolgt die Auftrennung der negativ geladenen Nukleinsäuren aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Konformation in einem elektrischen Feld. Als Matrix dafür wird 1,2%ige Agarose in TBE-Puffer erhitzt und mit 5µl Ethidiumbromid pro 100ml versetzt. Ethidiumbromid ist ein mit DNS interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der bei Anregung durch ultraviolettes Licht (UV-Licht) zum Fluoreszieren gebracht werden kann. In den Gelträger, der die Form des Gels bestimmt, wird bis zum Erkalten ein zwölfzinkiger Probenkamm eingesetzt. Nach Erkalten wird der Probenkamm entfernt und das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer (Minnie the gel Cicle TM HE 33, Hoefer Scientific Instruments) gelegt. In die nach Abbinden des Gels entstandenen Probenaschen werden pro Öffnung 7µl des PCR-Produktes und 3µl Gelladepuffer einpipettiert. Um die Größe der zu analysierenden Fragmente nach der Elektrophorese bestimmen zu können, wird ein DNS-Größen-Standard eingesetzt (DNA-Gewichtsmarker VI). Dieser enthält 15 definierte Fragmente verschiedener Größen und erzeugt ein spezifisches Bandenmuster von 154 bis 2176 Basenpaaren. Durch den Vergleich der einzelnen Laufstrecken der Proben mit den einzelnen Banden des Markers lässt sich die Größe des Produktes ermitteln. Insgesamt werden 1µl des Gewichtsmarkers, 6µl TBE-Puffer und 3µl Gellade-Puffer pro Probe verwendet. Um eine möglichst weite Wanderungsstrecke zu durchlaufen, wird das Gel in den verwendeten horizontalen Elektrophorese-Kammern so orientiert, dass die Probenaschen nahe der Kathode liegen. Nach Anlegen einer Spannung von 80 Volt über eine Stunde, werden die Amplifikate unter einem UV-Schirm (Biometra TI 3) visuell dargestellt und mittels Kamera fotografisch gesichert (Biometra Bio Doc CCD-Camera).

2.2.5 Sensitivität

Die in dieser Arbeit verwendeten *Aspergillus*-Stämme werden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen (Braunschweig) bezogen. Für die Kulturen werden verschiedene *Aspergillus*-Stämme (unter anderem *Aspergillus fumigatus* DSM 790, DSM 819, DSM 63359) auf Sabouraud-Glucose-Agar ausplattiert, 24h bei 35°C bebrütet (Brutschrank: Heraeus Function Line B20) und weitere 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird auf die Kultur 10ml physiologische Kochsalzlösung gegeben. Mit einer Einwegpipette wird 1ml Suspension aspiriert, mit einem Mörser homogenisiert und photometrisch (Eppendorf Photometer 1101 M) mittels Verdünnung durch 0,9%ige Kochsalzlösung auf einen McFarland-Faktor von 0,5 (entspricht ca. 10^6 Kolonie bildende Einheiten=KBE/ml) abgeglichen. Weitere Verdünnungen erfolgen durch erneute Zugabe von Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10.

2.2.6 Etablierung der real-time-PCR

Nach Extraktion, Durchführung der konventionellen PCR und Darstellung der Amplifikate mittels Gelelektrophorese erfolgt die Etablierung der real-time-PCR. Für die spätere quantitative Messung wird zunächst eine Standardreihe einer definierten Kopienzahl an Plasmid-DNS erstellt. Zur Herstellung der Plasmid-DNS wird extrahierte und amplifizierte *Aspergillus-fumigatus*-DNS dem folgenden Verfahren unterzogen:

2.2.6.1 Klonierung und Transformation

Zunächst erfolgt die Klonierung der *Aspergillus-fumigatus*-DNS. Die Klonierung wird mittels TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) durchgeführt. Ein zuvor hergestelltes PCR-Produkt wird unter erneuter Zugabe von 0,25µl Taq-Polymerase bei 72°C im Thermocycler (Trio-Thermoblock, Biometra) erhitzt. Während dieser Extensionsreaktion wird durch die Taq-Polymerase an das jeweilige 3'-Ende der doppelsträngigen DNS ein Adenosin-Überhang ansynthetisiert. Diese 3'-terminale Base ist nicht komplementär gepaart, so dass sie keine stabile Form darstellt. Nach Durchführung erfolgt die Kontrolle mittels Gel-Elektrophorese (Kapitel 0). Anschließend wird mit der Klonierung begonnen.

Das vorliegende PCR-Produkt wird in der nun folgenden TOPO-Cloning-Reaktion durch Zugabe eines pCR-TOPO Vektors mit diesem ligiert. Dieser zeichnet sich durch 3'-Thymidin-Überhänge sowie durch die sich an den Enden befindliche Topoisomerase I aus. Diese Konstellation ermöglicht den Einbau des frischen, mit Adenosin-Überhängen versehenen PCR-Produktes in den Vektor (TA-Cloning). Dafür werden 0,5 bis 2µl PCR-Produkt mit 1,0µl pCR 2.1-TOPO vector (10ng/µl plasmid DNA, Invitrogen) pipettiert und anschließend mit sterilem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 5µl ergänzt. Dem vorsichtigen Umrühren mit der Pipettenspitze folgt eine fünfminütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur (ca. 25°C). Nach Inkubation erfolgt die Zugabe von 1,0µl sechsfach konzentrierter TOPO Cloning Stop Solution. Nach Mixen bei Raumtemperatur für 10s wird der Ansatz 30min auf Eis gelagert. Während der Kühlung entkoppelt sich die Topoisomerase I vom Vektor. In der Zwischenzeit werden die im Kit enthaltenen bei -80°C gelagerten immunkompetenten *Escherichia coli* Bakterien (*E. coli* Zellen, TOP 10 One Shot Zellen, Invitrogen) auf Eis aufgetaut. Bei anhaltender Kühlung auf Eis werden 2µl des zuvor hergestellten Ansatzes in das vom Hersteller bereit gestellte Gefäß mit immunkompetenten *E. coli* Bakterien (TOP 10 One Shot Zellen, Invitrogen) hineinpipettiert, vorsichtig vermischt und für 30min auf Eis inkubiert.

Während der Inkubation erfolgt die Transformation der ligierten Plasmide in die *E. coli* Zellen. Die entkoppelte Topoisomerase I soll zu einer, um das zwei- bis zehnfach verbesserten Transformationsrate führen. Die Transformationsreaktion wird durch eine exakt 30s dauernde Hitzeschockbehandlung bei 42°C beendet. Anschließend wird der Ansatz erneut 2min auf Eis gelagert.

Das SOC-Medium wird auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend werden 250µl dieses Mediums hinzugefügt. Das Gemisch wird bei 37°C für eine halbe Stunde bei horizontaler Lage und Bewegung inkubiert (Ampicillin-Selektion). Während der Inkubation im SOC-Medium exprimieren die plasmidtragenden Zellen ihre erworbene Antibiotika-Resistenz (Ampicillin-Resistenz ist plasmidkodiert). Nach Inkubation wird der Ansatz zu 50 und zu 100µl auf Ampicillin-haltigen Selektivplatten (LB-Platten) ausgestrichen. Die unterschiedlichen Volumina sollen sicherstellen, dass die Platten nicht überwachsen sind, beziehungsweise (bzw.), dass nicht zu wenige Kolonien heranwachsen. Es erfolgt eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Durch die Ampicillin-Zugabe ist es nur den plasmidhaltigen (Ampicillin-resistenten) Zellen möglich Kolonien zu bilden. Nach der Kultivierung entstehen weiße

bis blaue heterogene Kolonien von 1 bis 3mm Größe. Die Farbgebung weiß, hell-, bis tiefblau beruht auf einer Farbreaktion mit dem Kunstprodukt x-Galaktosidase (x-Gal), die den Selektivplatten neben dem Ampicillin zusätzlich beigefügt ist. Der verwendete pCR-TOPO Vektor enthält eine Promoterregion (LacZ α -Gen), die bei Unterbrechung durch eingesetzte DNS des PCR-Produktes (Insert) keine Farbreaktion mit x-Gal mehr eingehen kann, d. h. die entstehende Kolonie weist eine weiße Färbung auf. Plasmidtragende Zellen, welche kein Insert enthalten rufen durch Spaltung von x-Gal eine Farbreaktion hervor, bei der Brom-Chlor-Indigo entsteht, das sich durch eine tiefblaue Farbe auszeichnet.

Jetzt erfolgt das „Picken“ der weißen Kolonien (mit Insert). Mit einer Impföse wird nacheinander Material von mehreren weißen Kolonien asserviert. Zur Kontrolle werden zusätzlich zwei gefärbte Kolonien „gepickt“. Das erhaltene Material wird in 10 μ l TBE-Puffer je Kolonie resuspendiert. Jeweils 2 μ l der sich daraus ergebenden Ansätze durchlaufen eine Kontrolle mittels PCR und Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.3 und 0). Zusätzlich läuft eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mit (Abbildung 6).

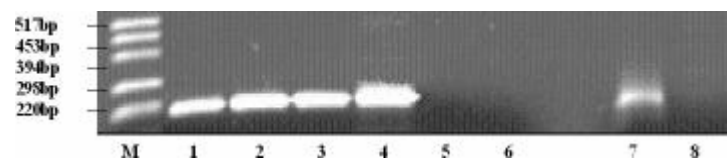


Abbildung 6: Gelelektrophorese der asservierten Kolonien, M: Marker VI, **1-4:** Klon 1-4 mit Insert (aus weißer Kolonie), **5+6:** Klon 5+6 ohne Insert (aus blauer Kolonie) **7:** Positivkontrolle, **8:** Negativkontrolle, bp = Basenpaare

Es erscheinen Banden in der richtigen Größe (212 Basenpaare). Klon 2 bis 4 werden für die Weiterverarbeitung ausgewählt. Die restlichen 8 μ l der in TE resuspendierten Kolonie (Klon 2 bis 4) werden jeweils in ein Röhrchen (Falcon) überführt, welches zuvor mit 3ml Flüssigmedium (LB-Medium) und 50 μ g/ml Ampicillin befüllt wurde. Diese Flüssigkulturen werden über Nacht (12h) bei 37°C unter Schütteln (220rpm) inkubiert. Um eine ausreichende Luftversorgung zu erreichen, werden die Gefäße während der Kultivierung nicht vollständig verschlossen. Anschließend werden 1,5ml von der Flüssigkultur, die das beste Wachstum (Trübung) vorweist, in ein Reaktionsröhrchen (Eppendorf) überführt und bei 10.000rpm für 10min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Das entstehende Pellet wird zur Plasmid-Isolierung verwendet.

2.2.6.2 Plasmid-Isolierung

Die weitere Plasmid-Isolierung erfolgt nach dem NUCLEOBOND kit for nucleic acid purification (MACHEREY-NAGEL). Das Pellet wird zunächst vorsichtig in 400 μ l Puffer S1 resuspendiert. Die darin enthaltene RNase zerstört vorhandene RNS (Ribonukleinsäure). Anschließend werden 400 μ l S2-Puffer zugegeben und die Suspension sechs- bis achtmal über Kopf geschwenkt. Dieser SDS-haltige Puffer bewirkt die Lyse der Zellen durch Denaturierung der zellulären Proteine sowie der Plasmid- und der chromosomalen DNS. Das Gemisch wird 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Präzipitation erfolgt jetzt die Zugabe von 400 μ l des kaliumacetathaltigen S3-Puffers mit darauf folgendem erneuten Schwenken der Suspension über Kopf (sechs- bis achtmal). Das Gemisch wird für 5min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 13.000rpm für 15min werden die denaturierten Proteine, Zelltrümmer und chromosomale DNS abgetrennt. Umgehend nach dem Zentrifugieren wird der klare Überstand in die dem Kit beigefügte Säule (cartridge AX 20, NUCLEOBOND) überführt. Die Plasmid-DNS wird an die Matrix der Säulen

gebunden. Diese wird vorher mit 1 ml N3-Puffer versetzt. Anschließend erfolgt dreimaliges Waschen mit jeweils 1 ml Puffer N4. Schließlich erfolgt die Elution der DNS von der Membran durch die Zugabe von 800 µl des Puffers N5 und Auffangen des Eluats in einem neuen Reaktionsgefäß.

Die gereinigte Plasmid-DNS wird jetzt mit 700 µl Isopropanol versetzt und 30 min mit 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgt das Herauswaschen der DNS mit 600 µl 70%igem Ethanol und Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min. Das entstandene Pellet wird nach fünfminütigem Trocknen in 36 µl sterilem Wasser resuspendiert und kann jetzt als Ausgangsprodukt für die Herstellung der quantitativen Standardreihe verwendet werden.

2.2.6.3 Erstellung der quantitativen Standardreihe

Zunächst wird die Konzentration des zuvor gewonnenen Eluats photometrisch bestimmt (Photometer: GeneQuant II RNS/DNS Calculator, Pharmacia Biotech, Cambridge, England). Zur Messung wird die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum) ermittelt. Die Messung erfolgt in der 10 mm Ultramikroküvette (Pharmacia Biotech, Cambridge, England). Der Nullabgleich wird mit sterilem Wasser durchgeführt. Es wird eine zehnmale Messung durchgeführt. Die ermittelten Werte werden mit einem Faktor multipliziert ($50 \mu\text{g DNS/ml} = 1 \text{ OD}$). Das Produkt entspricht der DNS-Konzentration der Lösung. Die entsprechenden Kopienzahlen pro Eluat können danach errechnet werden.

Anhand der errechneten Daten werden Verdünnungsreihen von $0,5 \times 10^7$ bis $0,5 \times 10^1$ Kopien/µl hergestellt. Ausgehend von einer $0,5 \times 10^{10}$ Kopien/µl enthaltenden Stammlösung werden Verdünnungen im Verhältnis eins zu zehn mit TE-Puffer durchgeführt. Dazu werden pro Schritt 10 µl der nächst höheren Verdünnungsstufe mit 90 µl TE-Puffer versetzt, d. h. pro Ansatz erhält man 100 µl, von denen 10 µl für die nächste Verdünnungsstufe eingesetzt werden. Die entstehende Verdünnungsreihe beinhaltet folgende Verdünnungsstufen:

10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 20, 10 Kopien/2 µl

Die Lagerung der Verdünnungsreihe erfolgt nach Zugabe des TE-Puffers bei 4°C. Nach Erstellung der Standardreihe erfolgt die Etablierung der TaqMan-PCR.

2.2.6.4 Funktionsprinzip der TaqMan-PCR

Das Grundprinzip der TaqMan-PCR ist mit dem einer klassischen PCR gleich zu setzen. Ausgangsprodukt ist ein doppelsträngiges DNS-Stück, welches die gesuchte Sequenz enthält und als Matrize dient. Durch Hitzebehandlung wird die doppelsträngige DNS in Einzelstränge (Denaturierung) aufgespalten. Es folgt die Annealing-Phase, in der definierte Primer (Oligonukleotide) die gesuchte Sequenz einrahmen, hybridisieren und durch eine DNS-Polymerase verlängern. Durch Wiederholung dieses Vorgangs (im Allgemeinen 25 bis 40 Zyklen) wird eine exponentielle Vermehrung der Sequenz erreicht.

Danach erfolgt im Rahmen der konventionellen PCR die Analyse des Reaktionsprodukts über die größenabhängige gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente oder über die Hybridisierung mittels spezifischer Sonden.

Bei der TaqMan-PCR (auch real-time-PCR) erfolgen die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß. Zusätzlich wird die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNS-Polymerase zur Generierung eines messbaren Signals während der PCR ausgenutzt. Dafür wird der PCR eine für die Zielsequenz spezifische Sonde zugesetzt. Diese wird mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert, einem sogenannten Reporter-Farbstoff (Fluorescein-Derivat) am 5'-Ende sowie einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) am 3'-Ende.

Zusätzlich ist die Sonde mit einem Phosphatrest blockiert. Durch die Nähe des Quencher-Farbstoffes kommt es bei Anregung der Sonde durch eine spezifische Wellenlänge (488nm) zu einem Förster-Energietransfer, der die emittierte Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes unterdrückt. Während der PCR bindet die spezifische Sonde an die denaturierte Zielsequenz. Die Taq-Polymerase trifft während der Extensionsphase auf die Sonde und beginnt diese zu verdrängen. Durch 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase, die jetzt aktiviert wird, kommt es zur Spaltung der Sonde und damit zur Trennung des Energietransfers zwischen Reporter- und Quencher-Farbstoff. Es entsteht ein fluoreszierendes Signal im Frequenzbereich des Reporters. Dieses ist sequenzspezifisch, da nicht vollständig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden, bevor die Polymerase aktiviert wird. Anschließend wird die Synthese des Gegenstranges zu Ende geführt (Abbildung 7).

Mit ansteigender Zahl der Zyklen werden proportional zu den synthetisierten PCR-Produkten immer neue Reporter-Moleküle freigesetzt, die zu einem ebenfalls proportionalen Anstieg der Fluoreszenzsignale führen. Die Fluoreszenz wird Zyklus für Zyklus während jedes Amplifikationsschrittes erfasst und kann grafisch dargestellt werden.

In den ersten 20 bis 35 Zyklen (abhängig von der PCR) reicht in der Regel die Menge der Fluoreszenz gebenden Spaltprodukte nicht aus, um ein signifikantes Signal zu erfassen. Der Wert, bei dem der erste deutliche Anstieg des spezifischen Sondensignals erfasst wird, wird als Grenzwert (threshold) bezeichnet, die Berechnung erfolgt aus der zehnfachen Standardabweichung der ersten 15 detektierten Signale. Je mehr Startkopien in die PCR anfangs eingebracht werden, desto früher wird ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Der dazu gehörige Zyklus wird als Schwellenzyklus (threshold cycle = Ct) bezeichnet. Er ist ein zuverlässiger Parameter für die Quantifizierung der zu Beginn einer PCR vorhandenen Matrizenzahl. Es erfolgt anschließend die Phase des exponentiellen Anstieges mit Überschreitung des Grenzwertes. Nach einer Gesamtlänge von 35 bis 40 Zyklen stellt sich eine Plateauphase ein, d. h. es findet durch verbrauchte PCR-Reagenzien keine signifikante Neusynthese mehr statt. Des Weiteren wird die Annealing-Phase durch das Vorhandensein großer Amplifikat-Mengen gestört. Die Höhe des Plateauwertes gibt Auskunft über die Effizienz der PCR (Reaktionsbedingungen, Ausgangsmaterialien).

Die Quantifizierung der Startkopienzahl einer unbekannten Probe erfolgt mittels Einsetzen eines quantitativen Standards in Form einer definierten Verdünnungsreihe. Die Ct-Werte werden gegen den Logarithmus der Startkopienzahl dieser Reihe, automatisch durch die Software des Systems, grafisch als Gerade dargestellt. Die Quantifizierung der unbekannten Probe erfolgt durch Extrapolation dieser sogenannten Standardkurve.

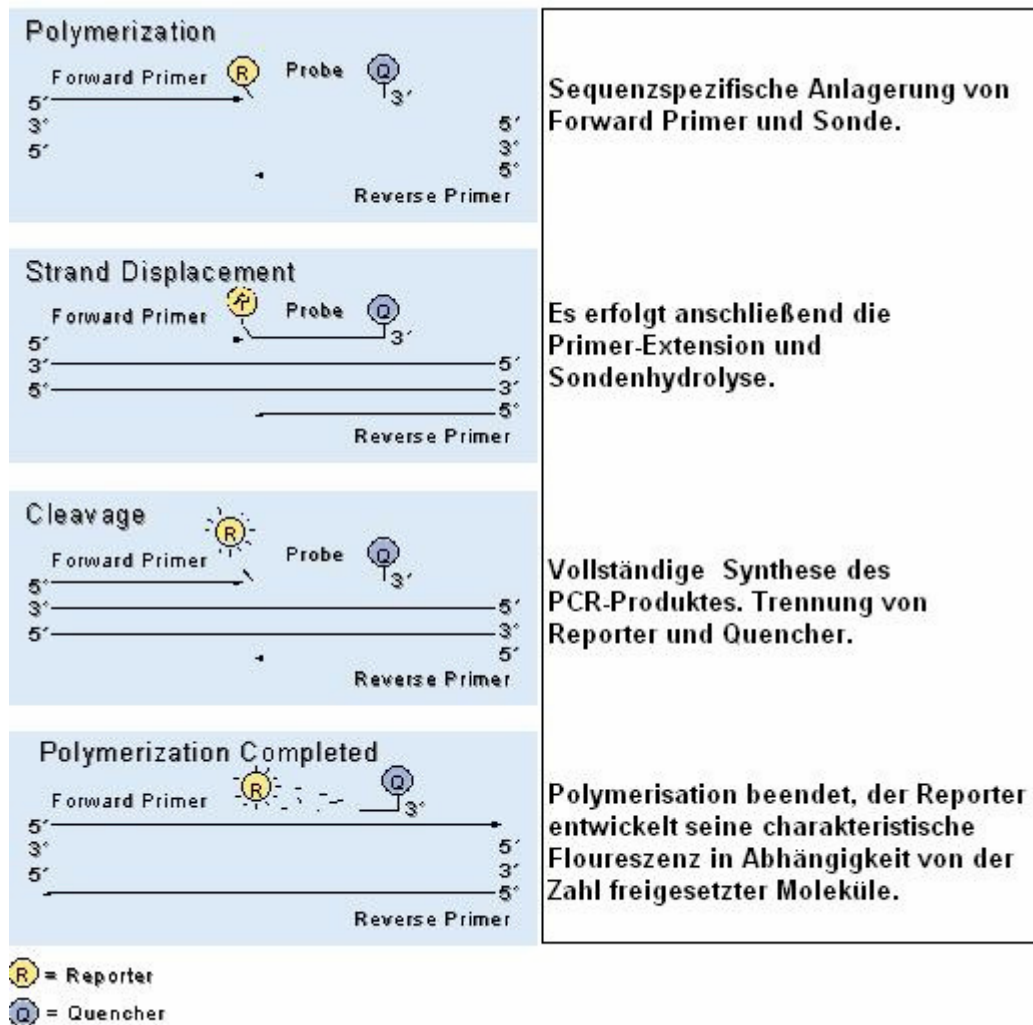


Abbildung 7: Einfluss der Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DN-Polymerase auf eine fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan-PCR.

2.2.6.5 ABI Prism 7700 Sequence Detection System (7700 SDS)

Als Gerät diente der ABI PRISM 7700 SDS (Perkin Elmer, Applied Biosystems). Dieser besitzt einen eingebauten Thermocycler, basierend auf der Technologie des GeneAmp PCR Systems 9600. Zusätzlich wurde ein optischer Heizdeckel entwickelt, der die optische Detektion des Fluoreszenzsignals gewährleistet. Über jeder Thermocyclerposition befindet sich eine Linse, die den Laserstrahl in das jeweilige Reaktionsgefäß weiterleitet. Die Fluoreszenz-Anregung erfolgt durch einen Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488nm. Der Laserstrahl wird mittels eines Multiplexers (MUX) auf jede einzelne Position verteilt, ein kompletter Plattenscan (96 Positionen) erfolgt innerhalb von 7s. Eine charge-coupled-device-camera (CCD-Kamera) misst ebenfalls alle 7s die Fluoreszenzemission jeder einzelnen Probe in einem Bereich von 500 bis 660nm und wandelt das Signal digital um. Die Analyse sowie die Steuerung der des Systems wird über einen Power Macintosh 4400 durchgeführt.

2.2.6.6 Ansatz und Durchführung der TaqMan-PCR

Ein PCR-Ansatz (Mastermix) mit einem Volumen von 50µl besteht aus den in Tabelle 4 beschriebenen Teilkomponenten. Dieser wird unter Kühlung mit Eis hergestellt. Die eingesetzte Sonde ist mit den Farbstoffen FAM (6 –Carboxy-Fluoreszein) und DABCYL markiert. Die einzelnen Farbstoffe einschließlich des Referenzfarbstoffes ROX (6 –Carboxy-X-Rhodamin) entwickeln ihre fluoreszierende Wirkung bei verschiedenen Wellenlängen: FAM bei 518nm und ROX bei 602nm.

Das verwendete *Aspergillus-fumigatus*-spezifische Primerpaar ist das gleiche, das in der konventioniellen PCR (Kapitel 2.2.3) eingesetzt wurde. Mit diesem Primerpaar wird eine 212 Basenpaare lange Sequenz aus dem *Aspergillus-fumigatus*-Genom herausgefiltert. In diesem Fragment liegt eine Zielsequenz, an der die über die Gendatenbank ermittelte Sonde ansetzt (Abbildung 8).

```
ATTGACATGGTTGAGCTTAGCCAGGAACAGTCCTTTGAGGGTGTAGAACTCTGCCTTTTGTGTGCGCCGAAGTAGTTGA 1021
TAACTGTACCAACTCGAATCGGTCCTTGACGGAACTCCCACATCTTGAGACGGAAAAACAACACGCGGCTTCATCAACT

GATTGTGTTGTTGATTACGTCCAATCCACTGTTGAGTTCCTTGGGATTTTGATAATGACATTTTGCCTGTTCTCGCAGCTT 1102
CTAAACACAACAATAATGCAGGTTAGGTGACAACTCAAGGAAACCTAAAACCTATTACTGTAAAACGGACAAGAGCGTCGAA

TCAGGAAAGCCTCTTGATTTCATGTTGGGTAGGGTATAAATCCGGCTGAGCTGGTTGATGCAGACTT 1171
AGTCCTTTCGGAGAACCTAAAGTTACAACCCATCCCATATTTAGGCCGACTCGACCAACTACGTCTGAA
```



Abbildung 8: Lokalisation der Primer (forward and reverse) und der *Aspergillus-fumigatus*-spezifischen Sonde (Genbank accession number: AF 22238), Primer: grau hinterlegt, Sonde: gelb hinterlegt.

Primer 1: 5'- CCA GCT CAG CCG GAT TTA TAC C-3' 22-mer (reverse)
Primer 2: 5'- CAT GGT TGA GCT TAG CCA GGA AC-3' 23-mer (forward)
Sonde: 5'- TGC GAG AAC AGG CAA AAT GTC ATT GTC ATT ATC AAA ATC C – 3'

Tabelle 4: Zusammensetzung des Mastermix für die TaqMan-PCR, ca. 48µl (48,33µl) Gesamtvolumen/Probe

Volumen in µl	Teilkomponenten des Mastermix:	Hersteller:
27,95	Aqua ad injectabila	Braun
5,00	10 x PCR-Puffer	Invitrogen, Gibco
4,50	MgCl ₂ (50mM)	Invitrogen, Gibco
4,00	dNTP (2,5mM)	BRL
0,80	TE-Puffer (pH 8, 10mM TRIS, 1mM EDTA)	
0,33	ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin, 150 µM)	TIB Molbiol
2,50	Primer 1 (10µM)	TIB Molbiol
2,50	Primer 2 (10µM)	TIB Molbiol
0,50	Sonde (10µM)	TIB Molbiol
0,25	Taq Platinum Polymerase (5 U/µl)	Invitrogen, Gibco

Der Mastermix wird jeweils zu 48µl in ein Reaktionsgefäß einer Mikrotiterplatte (MicroAmp Optical 96-Well Plate) pipettiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 2µl Probe je Gefäß. Jede Probe wird zweifach gemessen. Zwei Gefäße ohne Probe werden bei jedem Lauf als Negativkontrolle mitgeführt. Die Mikrotiterplatte wird mit optischen Deckeln verschlossen. Um zu gewährleisten, dass die Reaktionsansätze keine Luftblasen beinhalten, wird die Platte bei 10.000rpm eine Minute zentrifugiert.

Anschließend erfolgt die Durchführung der TaqMan-PCR mit dem ABI PRISM 7700 SDS. Der Thermocycler durchläuft die in Tabelle 5 angegeben Zeitintervalle:

Tabelle 5: Thermocycler-Einstellungen für die Durchführung der TaqMan-PCR

95°C	5	min	
95°C	30	s	}
			} 45 Zyklen
65°C	1	min	}
4°C	∞		

2.3 Definition der invasiven Aspergillose

Die Patienten werden hinsichtlich des Verdachts, an einer invasiven Aspergillose erkrankt zu sein, in verschiedene Gruppen unterteilt. Da das klinische Bild stark variiert, ist ein standardisiertes Schema, aufbauend auf festgelegte klinische und diagnostische Kriterien, für eine Einteilung unerlässlich. Als Grundlage dienen die im Jahr 2002 entwickelten Richtlinien der European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) und des National Institute of Allergy and Infectious diseases (IFICG) (35).

Die Aufsplittung erfolgt in drei verschiedene Gruppen, die den Verdacht einer invasiven Aspergillose in möglich, wahrscheinlich und bewiesen unterteilen. Hiernach gilt: Eine invasive Aspergillose ist als bewiesen anzusehen, wenn der histopathologische oder zytopathologische Nachweis von *Aspergillus*-Hyphen in Biopsaten oder Sektionsmaterial gelingt. Ebenfalls als bewiesen gilt der Nachweis von *Aspergillus*-Wachstum in der Kultur aus primär sterilem Gewebe in Kombination mit klinischen oder radiologisch auffälligen Befunden (Abbildung 9).

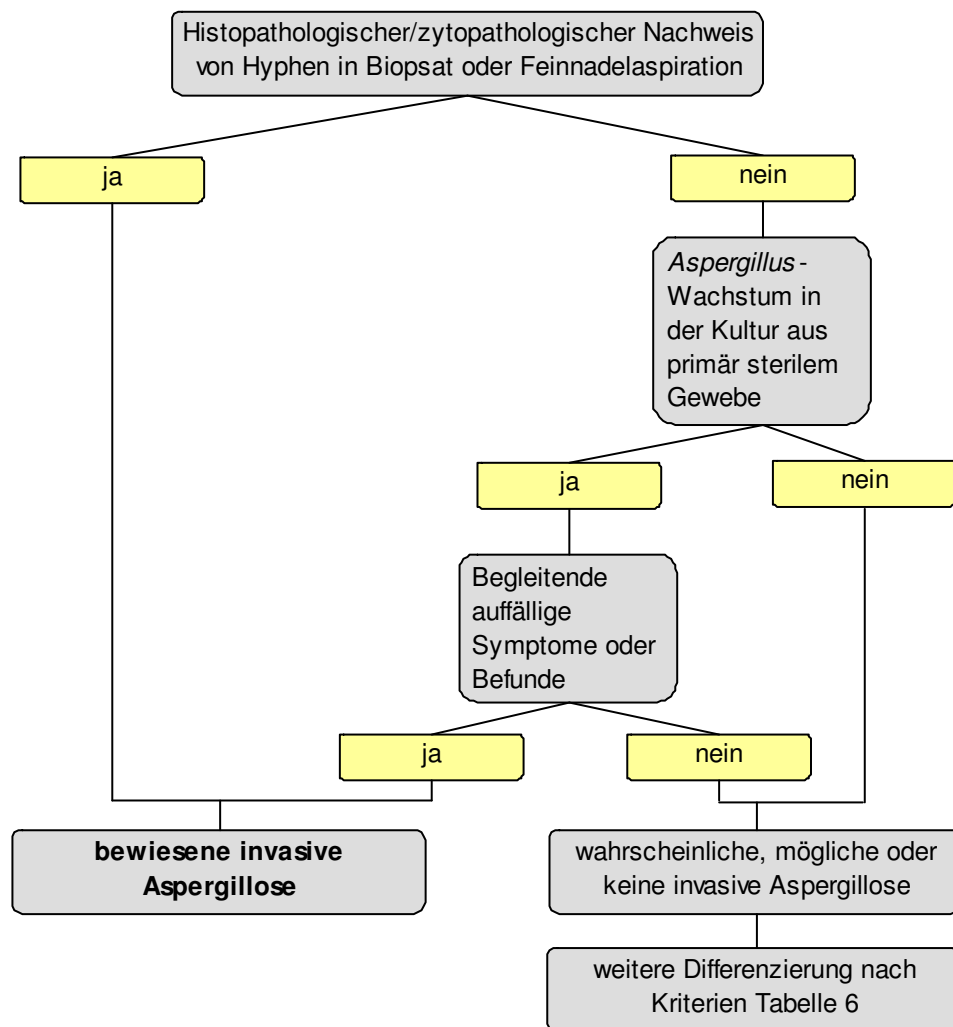


Abbildung 9: Flussdiagramm zur Bewertung einer bewiesenen invasiven Aspergillose

Sollten keine Nachweise in der oben angegebenen Form erbracht werden können, so erfolgt die weitere Abschätzung der Situation an Hand bestimmter laborchemischer, mikrobiologischer sowie klinischer Parameter. Letztere werden in Major- und Minorkriterien unterteilt. Anhand der Tabelle 7 lässt sich eine mögliche oder wahrscheinliche invasive Aspergillose-Infektion unter Beachtung der Gesichtspunkte in Tabelle 6 definieren.

Tabelle 6: Parameter, die für die Einteilung in eine wahrscheinliche oder mögliche invasive Aspergillose beachtet werden müssen.

Für eine mögliche oder wahrscheinliche Aspergillose-Infektion muss jeweils ein Wirtskriterium nachweisbar sein.
<p>Eine wahrscheinliche invasive Aspergillose-Infektion liegt vor, wenn zusätzlich zwei Parameter nachgewiesen werden können:</p> <ul style="list-style-type: none"> • mindestens ein mikrobiologisches Kriterium • mindestens ein klinisches Major Kriterium oder zwei klinische Minor-Kriterien.
<p>Eine mögliche invasive Aspergillose-Infektion liegt vor, wenn zusätzlich ein Parameter nachgewiesen werden kann:</p> <ul style="list-style-type: none"> • mindestens ein mikrobiologisches Kriterium oder mindestens ein klinisches Major-Kriterium oder zwei klinische Minor Kriterien.

Tabelle 7: Kriterien zur Einteilung in die Gruppen der wahrscheinlichen oder möglichen invasiven *Aspergillus*-Infektionen (modifiziert nach Ascioglu et al. 2002).

1) Wirtskriterien:			Neutropenie < 500 Neutrophile/mm ³ für > 10 Tage
			Refraktäres Fieber > 4 Tage unter Therapie mit Breitspektrum-Antibiotika
			Körpertemperatur > 38°C oder < 36°C und einer der folgenden Risikofaktoren: <ul style="list-style-type: none"> Anhaltende Neutropenie (> 10 Tage) innerhalb der letzten 60 Tage Starke Immunsuppressiva innerhalb der letzten 30 Tagen Zurückliegende bewiesene oder wahrscheinliche Pilzinfektion AIDS-Infektion
			Zeichen und Symptome einer Graft-versus-Host-Disease
			Kortikostroid-Therapie > 3 Wochen in den letzten 60 Tagen
2) Mikrobiologische Kriterien:			Positive Kultur/Zytologie von <i>Aspergillus</i> aus Bronchiallavage oder Sputum
			Nachweis von <i>Aspergillus</i> -Antigen in der Bronchiallavage oder in einer Blutprobe
3) Klinische Kriterien:			
3a)	Infektion des unteren Respirationstrakts:	Major:	<ul style="list-style-type: none"> „halo-sign“, „air-crescent-sign“ oder Hohlraum innerhalb einer Konsolidierung in der Computertomographie
		Minor:	<ul style="list-style-type: none"> Symptome einer Infektion der unteren Atemwege: Husten, Dyspnoe, Brustschmerz, Hämoptysen, Pleurareiben Radiologische Infiltrate, die nicht den Majorkriterien zugeordnet werden können
3b)	Sinonasale Infektion:	Major:	<ul style="list-style-type: none"> Radiologischer Nachweis einer Infektion im Sinonasal-Trakt
		Minor:	<ul style="list-style-type: none"> Symptome einer Infektion der oberen Atemwege bei fehlendem radiologischem Nachweis Ulcerationen/Nekrosen der Nasen-/Mundschleimhaut Epistaxis Periorbitale Schwellung
3c)	Infektion des ZNS':	Major:	<ul style="list-style-type: none"> Radiologischer Nachweis einer ZNS-Infektion
		Minor:	<ul style="list-style-type: none"> Symptome einer ZNS-Infektion bei fehlendem radiologischem Nachweis: <ul style="list-style-type: none"> Hemiparese, Hirnnervenausfälle und andere fokale Symptome Mentale Veränderungen Meningitische Zeichen Liquorauffälligkeiten
3d)	Disseminierte Pilz-Infektion:	Major:	Nachweis papulöser/nodulärer Hauteffloreszenzen, intraokulare Veränderungen, Leber-, Milz-Streuherde

ZNS = zentrales Nervensystem

3 Ergebnisse

3.1 Patienteneinteilung

In die Untersuchung werden 269 Proben von 204 Patienten eingeschlossen. Davon werden 67 Patienten (71 Proben) aus der Lungenfachklinik Heckeshorn einem sogenannten Vergleichskollektiv zugeordnet. Diese Patienten unterliegen keiner hämatologischen Grunderkrankung. Nach den in Kapitel 2.3 festgelegten Kriterien werden 66 Patienten (98,5 %) als negativ hinsichtlich der Erkrankung an einer invasiven Aspergillose bewertet (siehe Kapitel 3.3.1). Ein Patient wird laut Kriterien der Erkrankung an einer möglichen invasiven Aspergillose zugeordnet.

Im Patientenkollektiv werden 198 Proben von 137 Patienten von verschiedenen hämatologischen/onkologischen Abteilungen (siehe Kapitel 2.1.2) untersucht. Bei insgesamt acht Patienten liegt eine histologisch gesicherte und damit bewiesene Aspergillose vor. Bei allen Patienten kann histologisch ein *Aspergillus fumigatus* nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich im Einzelnen um sechs pulmonale invasive Aspergillosen, eine zerebrale Aspergillose sowie um einen Sonderfall einer lokalen *Aspergillus*-Infektion des Auges (Tabelle 10). Sechs von acht Patienten sind verstorben. Bei den beiden nicht an der Aspergillose-Infektion verstorbenen Patienten, handelt es sich um den Patienten mit der lokalen okulären Infektion sowie um einen Patienten mit einer invasiven pulmonalen Aspergillose. Ein detaillierter Verlauf dieser beiden Patienten folgt in Kapitel 3.3.4.

Weitere acht Patienten werden der Gruppe der wahrscheinlichen (Tabelle 11) und weitere 42 der Gruppe der möglichen invasiven Aspergillose zugeordnet (Tabelle 12). Bei 79 Patienten werden laut vorgegebenen Kriterien keine Zeichen einer invasiven Aspergillose gesehen (Tabelle 13).

3.2 Molekularbiologische Verfahren

3.2.1 Entwicklung der DNS-Extraktion

Es erfolgt zunächst die Etablierung eines geeigneten Extraktionsverfahrens, mit dem sich reproduzierbar DNS aus verschiedensten Untersuchungsmaterialien extrahieren lässt. Dafür wird ein enzymatisch-chemisches Verfahren mit einem enzymatisch-mechanischem Verfahren verglichen. Als initiales Ausgangsmaterial dient eine Pilzsuspension, bestehend aus einer in physiologischer Kochsalzlösung gelösten *Aspergillus-fumigatus*-Reinkultur (siehe Kap. 2.2.5).

Extraktion 1 (enzymatisch-chemisch):

Als Vergleich zur enzymatisch-mechanischen Extraktion wird eine etablierte enzymatisch-chemische Methode durchgeführt. Nach Durchführung dieses Verfahrens mittels Einsatz magnetischer beads (Dynabeads) lässt sich reproduzierbar DNS von verschiedenen *Aspergillus*-Species (*Aspergillus fumigatus* DSM 790, DSM 819, DSM 63359, *Aspergillus flavus* ATCC 9643, *Aspergillus niger* ATCC 10535, *Aspergillus terreus* ATCC 10690, *Aspergillus solani* DSM 1164) extrahieren. In den anschließend getesteten Verdünnungsreihen zur Sensitivitätstestung lässt sich eine untere Nachweisgrenze von 10^4 KBE/ml *Aspergillus-fumigatus*-DNS beobachten (siehe Abbildung 10).

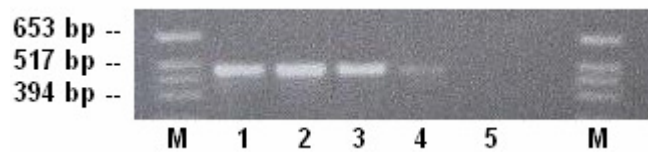


Abbildung 10: DSM 790: M: Marker VI, **1:** McFarland 1, **2:** McFarland 0,5 (entsprechend 10^6 KBE/ml), **3:** 10^5 KBE/ml, **4:** 10^4 KBE/ml, **5:** 10^3 KBE/ml, bp = Basenpaare

Extraktion 2 (enzymatisch-mechanisches Verfahren):

Anschließend wird die Extraktion mit dem Schwerpunkt der mechanischen Aufspaltung der Zellwände unter Verwendung des FastPrep cell disrupters (BIO 101) durchgeführt. Die im dazugehörigen Kit enthaltene Lysing-Matrix enthält drei verschiedene Komponenten (Sphere, Cylinder und Garnet Matrix), aus denen verschiedene Kombinationen erstellt werden können. Es lässt sich durch den Einsatz von „Sphere und Garnet“ reproduzierbar DNS extrahieren. Mit allen anderen Kombinationen gelingt in der anschließenden PCR wiederholt keine DNS-Amplifikation.

Es wird versucht, eine Extraktion ohne den Zusatz des RCLB-Puffers durchzuführen, um die Gesamtdauer des Extraktionsvorgangs zu minimieren. Das Auslassen erweist sich jedoch als ineffektiv, da damit das vollständige Auswaschen des Hämoglobins nicht erreicht werden kann. In der anschließend durchgeführten konventionellen PCR lässt sich bei 25% der Proben weniger, bei allen anderen keine DNS amplifizieren. Ebenfalls der Versuch, die Lyse der Erythrozyten parallel zur Lyse der Leukozyten durchzuführen, bleibt erfolglos. In den Proben, die zeitgleich mit RCLB- und WCLB-Puffer inkubiert werden, kann in der folgenden PCR keine DNS amplifiziert werden.

Es werden verschiedene Geschwindigkeiten, mit denen die Proben im FastPrep cell disrupter bewegt werden, getestet. Bei 4,5 und 5m/s kann keine DNS nachgewiesen werden. Erst bei einer maximalen Geschwindigkeit von 5,5m/s kann *Aspergillus-fumigatus*-DNS isoliert werden. Wie die Abbildung 11 zeigt, kann die Effizienz der DNS-Ausbeute verbessert werden, wenn die Dauer des „Schüttelns“ auf das Dreifache, von initial 30 auf insgesamt 90s verlängert wird. Nach jeweils 30s wird wegen der entstehenden Reibungswärme eine Pause gemacht und das Probengut auf Eis gelagert.

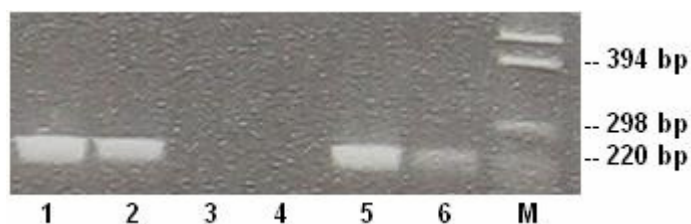


Abbildung 11: Extraktion mit verschiedenen Geschwindigkeiten bzw. Zeiten im FastPrep cell disrupter: **1 und 2:** 3 x 30s, 5,5m/s, **3 und 4:** 2 x 30s, 5m/s, **5 und 6:** 2 x 30s 5,5m/s, **M:** Marker VI, **1:** *Aspergillus fumigatus* (DSM 63359), **2:** *Aspergillus flavus* (ATCC 9643), **3:** *Aspergillus fumigatus* (DSM 63359), **4:** *Aspergillus flavus* (ATCC 9643), **5:** *Aspergillus fumigatus* (DSM 63359), **6:** *Aspergillus flavus* (ATCC 9643), bp = Basenpaare

3.2.2 Sensitivität

Nach Herstellung der Verdünnungsreihen gelingt nach Durchführung der konventionellen PCR der Nachweis von *Aspergillus-fumigatus*-DNA bis zu einer Konzentration von umgerechnet 10^1 KBE/ml (Abbildung 12).

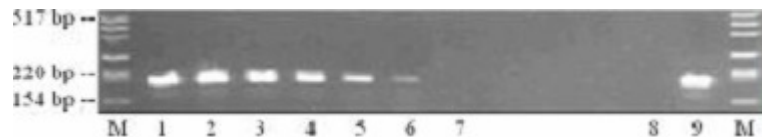


Abbildung 12: Verdünnungsreihe *Aspergillus fumigatus*, **1:** 10^6 KBE/ml, **2:** 10^5 KBE/ml, **3:** 10^4 KBE/ml **4:** 10^3 KBE/ml **5:** 10^2 KBE/ml **6:** 10^1 KBE/ml, **7:** 10^0 KBE/ml, **8:** Negativkontrolle, **9:** Positivkontrolle, **M:** Gewichtsmarker VI

Die für die Kalibrierung benötigte Standardkurve wird bis zu einer unteren Konzentration von 10 Kopien/2 μ l erstellt. In insgesamt fünf unabhängigen Testläufen kann eine untere Nachweisgrenze von 20 Kopien, entsprechend 0,1fg Plasmid-DNS erreicht werden (Tabelle 9). Zweimal (zu 40%) gelingt der Nachweis von 10 Kopien.

In Bezug auf die durch die Extraktion erreichte Sensitivität der Verdünnungsreihe, kann in der real-time-PCR eine untere Kopienzahl von 32 Kopien erreicht werden. Proben, die diesen Wert erreichen, werden als positiv bewertet.

3.2.3 Spezifität der verwendeten Primer/Sonde

Die zur Etablierung der Methode eingesetzten Panfungus-Primer erfassen alle in der Tabelle 8 angegebenen Pilzspezies. Die Amplifikatlängen variieren zwischen 480 und 500 bp. Einzelne Bakterien, sowie humane DNS werden ebenfalls getestet. Hier kann entweder keine DNS oder nur ein unspezifisches Bandenmuster erzeugt werden.

Es erfolgt anschließend die Durchführung der PCR mit den *Aspergillus-fumigatus*-spezifischen Primern, sowie der Sonde. Die zur Erfassung der *Aspergillus-fumigatus*-DNS eingesetzten Primer und Sonde amplifizieren selektiv die im Labor vorhandenen registrierten Stämme der *Aspergillus-fumigatus*-Spezies: *Aspergillus fumigatus* DSM 790, DSM 819, DSM 63359.

Andere Stämme bleiben ohne positives Signal, dazu gehören *Aspergillus flavus* ATCC 9643, *Aspergillus niger* ATCC 10535, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tamarai* ATCC 10690, *Aspergillus tamarai* ATCC 10836, *Aspergillus terreus* ATCC 10690, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* DSM 20614, *Candida krusei* DSM 70065, *Cryptococcus neoformans* ATCC 34544, *Fusarium solani* DSM1164, *Mucor sp.* DSM 1222, *Rhizopus oryzae* DSM 853, *Rhizopus oryzae* DSM 905 und *Trichosporon cutaneum* DSM 70675. Diese können nicht amplifiziert werden.

Tabelle 8: Spezifitäten der Panfungus-Primer versus *Aspergillus fumigatus*-spezifischer Primer

Untersuchte Pilz-/bzw. Bakterienkultur	Panfungus Primer	<i>Aspergillus- fumigatus</i> -spezifische Primer/Sonde
<i>Aspergillus flavus</i>	+	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> DSM 790	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i> DSM 819	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i> DSM 63359	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	+	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	+	-
<i>Aspergillus tamarii</i>	+	-
<i>Aspergillus terreus</i>	+	-
<i>Candida albicans</i>	+	-
<i>Candida glabrata</i>	+	-
<i>Candida kefyr</i>	+	-
<i>Candida krusei</i>	+	-
<i>Candida parapsilosis</i>	+	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	-
<i>Fusarium solani</i>	+	-
<i>Mucor</i>	+	-
<i>Rhizopus oryzae I</i>	+	-
<i>Rhizopus oryzae II</i>	+	-
<i>Trichosporon cutaneum</i>	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	unspezifisch	-

+ = DNS-Amplifikation, - = Keine DNS-Amplifikation.

3.2.4 Entwicklung der TaqMan-PCR

3.2.4.1 Auswahl der TaqMan-Sonde

Die für die TaqMan-PCR eingesetzte Sonde weist in Anlehnung an das 7700 SDS Workshop Manual, Version 2.1 (Dr. Thomas A Schild, Applied Biosystems GmbH Weiterstadt) bestimmte Eigenschaften vor:

- Der GC-Gehalt der Sonde liegt bei 38,2%. Er sollte zwischen 20 und 80% (optimal bei 50%) liegen.
- Die Länge der Sonde sollte, um eine ausreichende Spezifität zu erzielen, zwischen 20 und maximal 35 Nukleotiden liegen. Längere Sonden könnten durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen während der Hybridisierung zu Problemen führen. Die hier eingesetzte Sonde besitzt eine Länge von 34 Nukleotiden.
- Markierung mit einem Reporter-Farbstoff am 5'-Ende sowie mit einem Quencher-Farbstoff am 3'-Ende. Zur Markierung der eingesetzten Sonde wird als Reporter FAM, als Quencher DABCYL verwendet. DABCYL weist keine Eigenfluoreszenz auf und kann keine Interaktion mit FAM eingehen.
- Eine Phosphorylierung der Sonde liegt vor, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden.

Zusätzlich wird bei der Auswahl der Sonde die Platzierung des Quenchers berücksichtigt und der Quencher an das 3'-Ende der Sonde platziert. Zur optimalen Energieübertragung zwischen Reporter und Quencher ist eine räumliche Nähe der beiden zueinander wichtig [57]. Untersuchungen durch Livak [58] konnten nachweisen, dass die Positionierung des Quenchers am 3'-Ende der Sonde ideal ist, da hier die Bildung des PCR-Produktes vollständig nachgewiesen werden kann. Entsprechend der oben genannten Voraussetzungen wurde die Sonde über die Gendatenbank ermittelt (Genbank accession number: AF 22238) und weist folgende Sequenz auf:

FAM 5'- TGC GAG AAC AGG CAA AAT GTC ATT ATC AAA ATC C -3' DABCYL

Die Sondenmoleküle nehmen, isoliert betrachtet, durch das Vorhandensein negativ geladener Phosphatreste durch Abstoßungskräfte eine gestreckte Form an. Aufgrund der somit größeren Entfernung zwischen Reporter und Quencher kommt es zu einer Reduzierung des so genannten Quenching-Effekts. Um den abgeschwächten Quenching-Effekt zu verbessern, ist eine ausreichende Magnesium-Ionen-Konzentration wichtig. Die positiv geladenen Magnesium-Ionen sorgen für die Neutralisation der elektrostatischen Abstoßung innerhalb der Sondenmoleküle. Diese werden flexibler und bewirken durch räumliche Faltung eine Annäherung der Fluorophore und damit eine Verbesserung des Quenching-Effekts. In der vorliegenden Arbeit wird eine Konzentration von 4,5mM MgCl₂ (50mM) angewendet. Die empfohlenen Magnesium-Konzentrationen liegen zwischen 3,5 und 6mM.

3.2.4.2 Thermocycler-Einstellungen

Im Gegensatz zur klassischen PCR, die sich pro Zyklus aus den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Extension zusammensetzt, wird bei der hier durchgeführten TaqMan-PCR die Annealing- und die Extensionsphase zu einem Schritt zusammengefasst [59]. Der erste Schritt – die Denaturierung – wird sowohl bei der herkömmlichen PCR als auch bei der TaqMan-PCR angewendet. Hier werden die DNS-Stränge bei Temperaturen von 90 bis 95°C voneinander getrennt. In der nun folgenden Annealing-Phase lagern sich die Primer und Sonde bei Temperaturen um 55°C an den zu vervielfältigenden DNS-Abschnitt. Die Polymerisation beginnt klassischerweise bei 72°C in der sich anschließenden Extensionsphase. Nach Zusammenfassung der letzten beiden Schritte setzt sich jeder Zyklus nur noch aus zwei Temperatur-Stufen zusammen, aus 95°C sowie einer zweiten Temperatur zwischen 50 und 70°C. Bei niedriger letzterer Temperatur ist auf der einen Seite die Anlagerung der Primer verbessert, auf der anderen Seite kann es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen. In Abhängigkeit vom Schmelzpunkt der Primer werden Untersuchungen mit verschiedenen Thermocycler-Einstellungen vorgenommen. Es zeigt sich, dass bei einer Temperatur von 67°C keine ausreichende Amplifikation mehr erreicht wird. Bei einer Temperatur von 63°C werden falsch-positive Signale erfasst. Als Optimum erweist sich eine Temperatur von 65°C, die über eine Minute gehalten wird.

3.2.4.3 Die quantitative Standardreihe für die TaqMan-PCR

Zur Erstellung einer *Aspergillus-fumigatus*-spezifischen Standardreihe wird ein mittels FastDNA-Kit extrahierter *Aspergillus-fumigatus*-Stamm (DSM 819) gewählt. Nach Klonierung mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits wird die Konzentration des entstandenen Produktes photometrisch bestimmt. Bei einer optischen Dichte von 0,06g/l wird über der Molmasse mit Hilfe der Avogadro-Konstanten die Molekülzahl ermittelt. Die genaue Berechnung zur Erstellung der Standardreihe wird in der Tabelle 9 dargestellt.

Ausgehend von 10^{10} Kopien wird durch Verdünnung eine Standardreihe bis zu einer Konzentration von 10 Kopien/2µl pipettiert. Davon werden die letzten acht Stufen (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 20, 10 Kopien) in der TaqMan-PCR eingesetzt. Weniger Standardstufen bergen die Gefahr eines schlechten Korrelationskoeffizienten.

Tabelle 9: Kopienzahlberechnung zur Erstellung einer Verdünnungsreihe bekannter Kopienzahl:

PCR-Produkt:	212 bp
Vektor-Länge:	+ 3906 bp
Produktgröße:	4118 bp
Molekülmasse	= Produktgröße * durchschnittliche Molmasse eines Basenpaares
	= 4118 * 660g/mol
	= 2 717 880 g/mol
Konzentration laut OD:	0,06 g/l
	0.06g/l / 2 717 880 g/mol
	= 20 420*10 ⁻⁸ mol/l
Konzentration	= 20 420*10 ⁻⁸ mol/l * 6.02213670* 10 ²³ /mol Avogadro-Konstante
	= 12 297*10 ¹⁶ Moleküle/l
	= <u>12 297 400 432</u> <u>Moleküle/μl in der Ausgangs-probe</u>
Verdünnung :	10μl Ausgangsprobe + 14,6μl TE-Puffer
	= 10 ¹⁰ Kopien/2μl.
Konzentration in g:	12 297 400 432 Kopien/μl = 0.06 g/l = μg/μl
	1 Kopie/μl = 0.06 μg/μl / 12 297 400 432 Kopien/μl
	= 0.049 * 10 ⁻¹⁰ μg = 49 * 10 ⁻¹⁰ ng
	10 000 000 000 Kopien/μl = 0.049 μg
	= 49 ng
	10 ⁷ Kopien/μl = 49 pg
	10 ⁴ Kopien/μl = 49 fg
	10 Kopien/μl = 0,049 fg Plasmid-DNS

3.2.4.4 Detektion der Standardreihe

Nach erfolgter PCR wird zunächst die Standardreihe bewertet. Mit Hilfe des Amplifikations-Plots können die analysierten Daten dargestellt werden. Für jede Probe wird grafisch die relative Fluoreszenzintensität (ΔRn) über der Zyklusanzahl aufgetragen. Die Darstellung kann linear oder logarithmisch erfolgen (Abbildung 13, Abbildung 14).

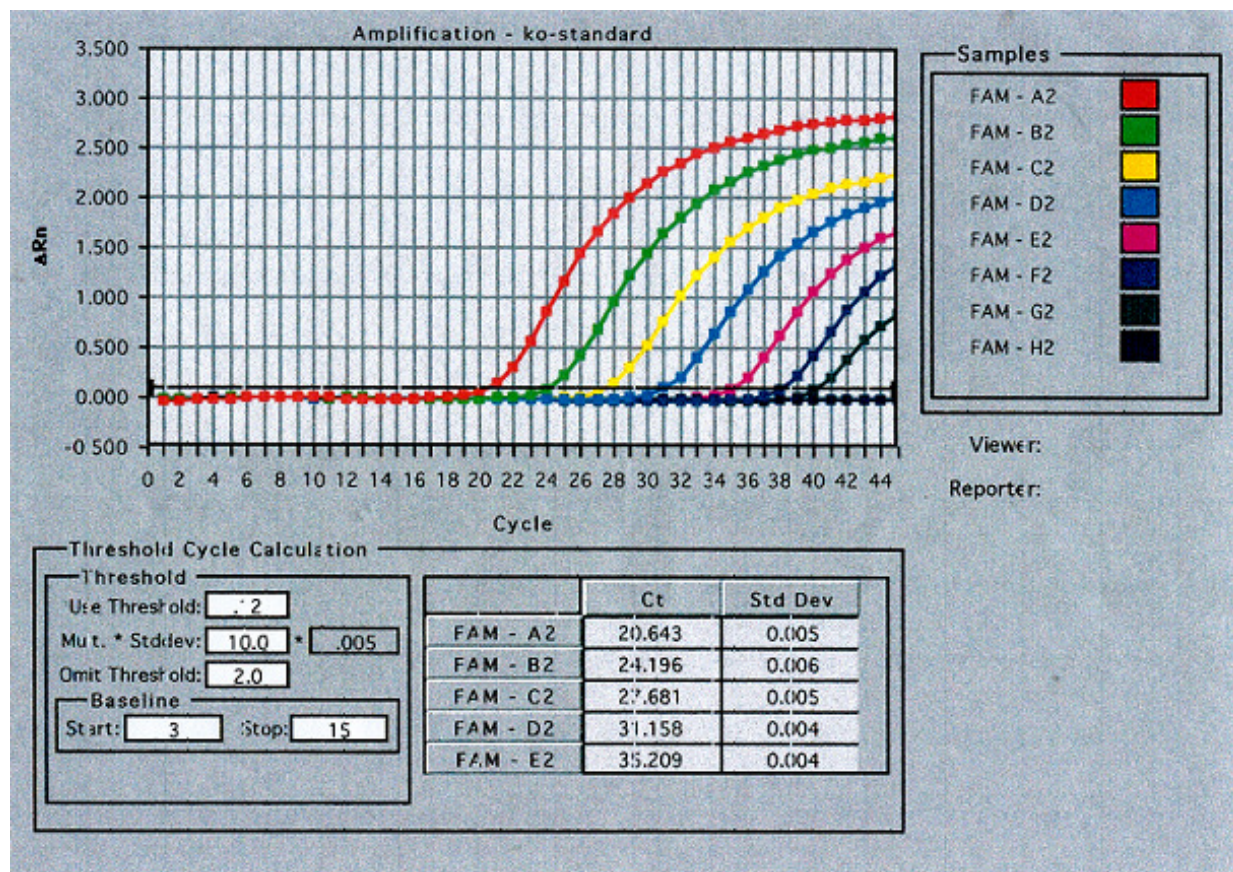


Abbildung 13: Lineare Darstellung der Standardreihe, ΔRn : Fluoreszenzintensität, Cycle: Zyklusanzahl

Anhand der bekannten Ct-Werte und der festgelegten Ausgangskonzentrationen ist die Ermittlung einer Kalibratorkurve möglich (Abbildung 14), mit der unbekannte Proben analysiert werden können. Als Standardkurve erscheinen alle Werte, die zu Reaktionsbeginn als Standardproben (STND) gekennzeichnet werden. Dabei wird der Ct-Wert über den $\log N$ der Startkopienzahl aufgetragen und eine Eichgerade ermittelt. Diese sollte im Idealfall eine negative Steigung zwischen 3,5 und 4,0 vorweisen. Das bedeutet, dass eine 100%ige Effektivität dann vorliegt, wenn sich die Anzahl der Kopien alle 3,5 bis 4,0 Zyklen um einen Exponenten erhöht. Die gemessenen Steigungswerte befinden sich zwischen -3,837 und -3,480. Der arithmetische Mittelwert beträgt -3,584. Aus der Abweichung der Einzelpunkte von der Eichgeraden wird ein Korrelationskoeffizient gebildet. Die Korrelation sollte bei einem möglichen maximalen Wert von 1,0 um die 0,98 betragen. Der mittlere Korrelationskoeffizient in den durchgeführten Untersuchungen beträgt 0,988, wobei die höchste Korrelation mit 0,999 und die geringste mit 0,969 gemessen werden kann.

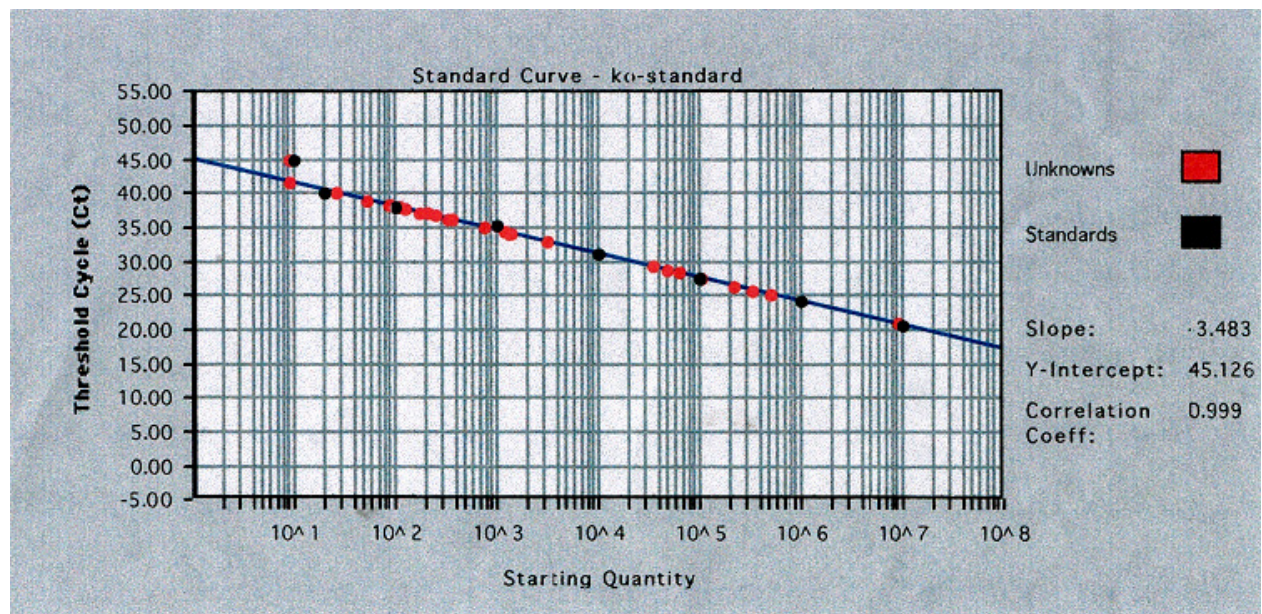


Abbildung 14: Standardkurve, schwarze Punkte markieren die vorgegebenen Kopienzahl der Standardreihe, rote Punkte die zu untersuchenden Proben. Ct: Zyklusanzahl, Starting Quantity: Ausgangsquantität in Kopienzahl/2 μ l

3.2.5 Testung verschiedener Materialien

Es werden verschiedene Materialien mit dem oben angegebenen Extraktionsverfahren getestet, dazu gehören Bronchiallavagen (inklusive Trachealsekreten und Bronchialsekreten), Pleurapunktate, Liquorproben und Blutproben. Zusätzlich werden Biopsate von Patienten mit bewiesener invasiver Aspergillose untersucht. Die Blutproben werden mindestens zweimal mit dem RCLB-Puffer vorbehandelt. Zuvor werden die Blutproben von nicht erkrankten Personen mit *Aspergillus-fumigatus*-Mycel versetzt und anschließend extrahiert. Es lässt sich wiederholt *Aspergillus*-DNS extrahieren. Eine Sensitivitätstestung wird nicht vorgenommen. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit andere Untersuchungsmaterialien wie Bronchiallavagen, Pleurapunktionen, Liquorproben und Biopsate von gesunden Probanden mit *Aspergillus*-Mycel zu versetzen und zu untersuchen, können diese Materialien nur an Hand der vorhandenen Patientenproben getestet werden. Aus diesen Materialien lässt sich bei Patienten mit bewiesener invasiver Aspergillose, ausser bei zwei Pleurapunktaten, *Aspergillus-fumigatus*-DNS extrahieren. Diese Pleurapunktate sind post mortem abgenommen worden. Unter den Patienten mit möglicher invasiver Aspergillose kann einmal *Aspergillus*-DNS in einem Pleurapunktat nachgewiesen werden.

3.2.6 Kontaminationsprophylaxe

Zur Kontaminationskontrolle werden bei jeder Extraktion und zusätzlich bei jedem PCR-Lauf Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Der für die Extraktion verwendete RCLB-Puffer wird nach dem Ansetzen vor der Weiterverarbeitung steril filtriert und autoclaviert. Anschließend erfolgt bis zur Weiterverarbeitung eine Lagerung bei 4°C in. Der WCLB-Puffer wird steril filtriert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Beide Puffer werden in Einzelvolumina von 50ml gesplittet. Bei Durchführung der PCR werden die Arbeitsschritte vor und nach der PCR in verschiedenen Räumen durchgeführt, um Carry-Over-Kontaminationen zu vermeiden. Die konventionelle und die real-time-PCR werden zusätzlich in getrennten Räumen durchgeführt. Die PCR-Vorbereitung erfolgt unter der Lamin Air Abzugsbank, in der ein stetiger laminarer Luftstrom herrscht. Die für den

Mastermix verwendeten Reagenzien werden vor ihrer Weiterverarbeitung einzeln aliquotiert. Das Pipettieren erfolgt mit sterilen Einmalpipetten mit Filtereinsatz. Der fertige Mastermix wird zur Inaktivierung eventuell vorhandener Kontaminationen vor dem Aufteilen auf die einzelnen Proben mit ultravioletem Licht bestrahlt. Da die Taq-Polymerase lichtempfindlich ist, wird sie erst nach der Bestrahlung dazu gegeben. Die Pipettierung der Standardreihe erfolgt aufgrund der hohen Konzentration der Plasmid-DNS als letztes. Vorher werden alle anderen Proben verschlossen.

Trotz der prophylaktischen Maßnahmen können Kontaminationen beobachtet werden. Dabei können während der Durchführung der konventionellen PCR, zweimal von insgesamt 36 Läufen Kontaminationen des gesamten Laufes und einmal eine Kontamination der Negativkontrolle beobachtet werden. Eine anschließende Testung sämtlicher Reagenzien bleibt negativ. Bei Durchführung der real-time-PCR kann eine Verunreinigung des gesamten Laufes nicht beobachtet werden. Jedoch treten einzelne positive Proben auf, bei denen eine Kontamination in Betracht gezogen werden kann. In zwei von insgesamt 34 Läufen handelt es sich um eine Kontamination der PCR-Negativkontrolle.

3.3 Untersuchungen von Patientenmaterial

Sämtliche Angaben der Kopienzahl in den folgenden Untersuchungen sind in jeweils 2µl Volumen gemessen worden. Alle Proben werden doppelt gemessen. Bei den verwendeten Werten handelt es sich um den Mittelwert.

3.3.1 Untersuchungen im Vergleichskollektiv

Als Vergleichsgruppe werden 71 bronchoalveoläre Lavagen von 67 Patienten herangezogen. Im Allgemeinen liegt je Patient eine Probe vor. Von vier dieser Patienten werden jeweils zwei Bronchiallavagen untersucht. Sämtliche Patienten weisen keine hämatologische Grunderkrankung auf.

Insgesamt vier der Bronchiallavagen weisen in der TaqMan-PCR Werte mit einem Mittelwert von 4 Kopien auf [1, 2, 4, 9]. Diese Werte werden, da sie unter dem Schwellenwert liegen als negativ bewertet. Ein einziger Wert liegt mit 1353 Kopien deutlich im positiven Bereich. Bei dem dazu gehörigen Patienten liegt als Grunderkrankung ein Bronchial-Karzinom vor. Aufgrund von anhaltendem antibiotikarefraktärem Fieber und klinischen sowie radiologisch auffälligen Lungenbefunden, ist eine Bronchoskopie durchgeführt worden. In der parallel angelegten Kultur lässt sich kein *Aspergillus fumigatus* isolieren. Laut den in Kapitel 2.3 angegebenen Kriterien wird er als Patient mit einer möglichen invasiven Aspergillose-Erkrankung angesehen. Neben der Möglichkeit der Erkrankung an einer invasiven Mykose durch *Aspergillus-fumigatus* könnte auch eine Kolonisation vorliegen. Auch eine Kontamination lässt sich nicht mit Sicherheit ausschließen.

Alle anderen Patienten (98,5%) werden hinsichtlich der Erkrankung an einer invasiven Aspergillose als negativ bewertet. Korrelierend dazu lässt sich in keiner der dazu gehörigen Proben ein relevanter TaqMan-Wert messen.

3.3.2 Untersuchungen im Patientenkollektiv

Es werden insgesamt 198 Proben von 137 Patienten untersucht. 51 Proben (25,8%) geben ein positives Signal, davon zeigen 76,9% (n=40) einen Wert, der über dem Cut-off-Wert liegt. Elf Proben bleiben mit einem arithmetischen Mittelwert von 6 Kopien unter dem festgelegten Schwellenwert. Bei den übrigen 147 Proben (74,2%) kann kein positives Signal gemessen werden.

Unter Betrachtung der verschiedenen Ausgangsmaterialien können folgende Ergebnisse ermittelt werden:

25 Bronchiallavagen, sieben Trachealsekrete und ein Bronchialsekret geben ein relevantes positives Signal. Drei Lungenbiopsate sowie ein Leberbiopsat zeigen ein positives Ergebnis. Des Weiteren lässt sich in einer Liquorprobe, in einem Pleurapunktat, sowie in einem Hornhautabradat relevante *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachweisen. Sämtliche Patienten dieses Kollektivs sind mit Nummern (Nr.) versehen und in Tabelle 10 bis Tabelle 13 dargestellt.

3.3.2.1 Bewiesene invasive Aspergillose

Acht Patienten (5,8%) von insgesamt 137 werden laut in Kapitel 2.3 angegebener Vorgabe zur Gruppe der bewiesenen invasiven Aspergillose zugeordnet. Dabei handelt es sich um drei disseminierte und drei pulmonale invasive Aspergillosen, eine zerebrale invasive Aspergillose sowie um eine lokale *Aspergillus-fumigatus*-Infektion des Auges.

Disseminierte invasive Aspergillose:

Alle drei Patienten sind an einer post mortem diagnostizierten disseminierten Aspergillose verstorben. Bei allen Patienten wird mindestens einmal ein positiver Wert in der TaqMan-PCR erreicht. Von zwei Patienten mit disseminierter Aspergillose liegen zusätzlich zur Bronchiallavage ein Lungenbiopsat sowie ein Lungen- und Leberbiopsat vor. In allen Proben lässt sich in der real-time-PCR *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachweisen.

Patient Nr. 1 verstarb an disseminierter Aspergillose. Der Nachweis von 7.200 Kopien *Aspergillus-fumigatus*-DNS gelingt in der Bronchiallavage vier Tage vor dem Tod. In der Sektion lässt sich eine disseminierte Aspergillose mit Lungen- und Leberbeteiligung nachweisen. In der TaqMan-PCR lässt sich in den Sektionsbiopsaten in der Lunge ein massiv erhöhter Wert von 563.000 Kopien, in der Leber ein weitaus geringerer Wert von 50 Kopien nachweisen. Von Patient Nr. 7 liegt neun Tage vor dem Tod eine Bronchiallavage vor, die einen Wert von 1.135 Kopien misst. Das post mortem untersuchte Lungenbiopsat misst 112 Kopien. Weitere Proben liegen nicht vor. Bei Patientin Nr. 5 liegt prae mortem ein Trachealsekret vor, in dem 3.750 Kopien nachgewiesen werden. Post mortem liegt ein Pleurapunktat vor, aus dem keine *Aspergillus fumigatus*-DNS isoliert werden kann.

Pulmonale invasive Aspergillose:

Zwei der drei Patienten sind verstorben. Von Patient Nr. 6 liegen insgesamt sechs Proben (fünf Bronchiallavagen und ein Trachealsekret) vor. Vor Beginn einer antimykotischen Therapie werden in der Bronchiallavage der rechten Lunge 2650, in der linken Lunge 2615 Kopien nachgewiesen. Nach antimykotischer Therapie werden 15 Tage später im Trachealsekret noch 56 Kopien, 17 Tage später in einer weiteren Bronchiallavage 132 Kopien und 18 Tage später in der Lavage der rechten Lunge 45, in der der linken Lunge 20 Kopien festgestellt. Der Patient wird lange intensivmedizinisch behandelt und kann nach insgesamt sechs Monaten das Krankenhaus verlassen. Ein detaillierter Verlauf ist in Abbildung 17 dargestellt. Von Patient Nr. 3 mit pulmonaler Aspergillose liegt ein Trachealsekret vor. In diesem lässt sich eine Kopienzahl von 92.500 nachweisen. Von Patientin Nr. 4 werden prae mortem in der Bronchiallavage 3.750 Kopien nachgewiesen. Im Pleurapunktat kann wie bei Patientin Nr. 5 post mortem keine *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachgewiesen werden.

Zerebrale Aspergillose:

Bei Patient Nr. 2 kann im Liquor bei prae mortem bewiesener zerebraler Aspergillose eine Kopienzahl von 520.000 Kopien nachgewiesen werden. Der Patient ist verstorben.

Lokale okuläre Aspergillose:

Von Patient Nr. 8 liegen insgesamt fünf Proben vor. Bei im Vorfeld bewiesener Aspergillose des rechten Auges, kann bei beiden Proben des rechten Auges *Aspergillus*-DNS nachgewiesen werden. Die erste Probe (Hornhautabradat) misst 35 Kopien, die andere (Kammerwasser) nach einer antimykotischen Behandlung noch 11 Kopien und liegt damit unter dem Schwellenwert. Aufgrund des verschiedenen Probenmaterials kann jedoch nicht beurteilt werden, wieviel *Aspergillus*-DNS sich vor der antimykotischen Behandlung im Kammerwasser befand. 16 Tage später wird ein Biopsat des rechten Auges untersucht. Bei der Biopsat-Probe des rechten Bulbus oculi handelt es sich um den Zeitpunkt der Eukleation nach erfolgter antimykotischer Therapie, diese Probe bleibt negativ. Ebenfalls negativ bleiben die beiden Proben des linken Auges. In diesem kann weder klinisch noch in anderen Untersuchungen eine *Aspergillus*-Infektion nachgewiesen werden. Der Patient hat überlebt.

Insgesamt liegen 22 Proben in dieser Gruppe vor, d. h. im Mittel 2,75 Proben pro Patient. 68,2% (n=15) weisen ein positives Ergebnis in der TaqMan-PCR vor. In fünf der Proben lässt sich keine *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachweisen (Abbildung 15). Bei zwei der negativen Proben handelt es sich um Sektionsmaterial (Pleuraerguss).

Die Werte der als positiv gewerteten Proben innerhalb der Gruppe der bewiesenen Aspergillose liegen im Bereich von 45 bis 563.000 Kopien (Tabelle 10). Der arithmetische Mittelwert liegt bei 79.808,7 Kopien (Abbildung 16).

3.3.2.2 Wahrscheinliche invasive Aspergillose

Es können acht (5,8%) Patienten mit wahrscheinlicher invasiver pulmonaler Aspergillose evaluiert werden. Insgesamt liegen vier Trachealsekrete und fünf Bronchiallavagen vor. Bei Patient Nr. 9, 10, 13 und 16 liegt jeweils ein Trachealsekret vor. In drei der Proben können 3950/350 bzw. 43 Kopien nachgewiesen werden. Drei von fünf Bronchiallavagen bleiben negativ, davon gehören zwei zu Patientin Nr. 14. In den beiden positiven Lavagen werden 203 und 63 Kopien nachgewiesen.

Insgesamt kann in fünf von neun Proben (55,6%) *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachgewiesen werden. Bezogen auf die Patienten kann bei fünf von acht Patienten (62,5%) *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachgewiesen werden (Abbildung 15). Der Bereich der fünf positiven Proben in der Gruppe der wahrscheinlichen invasiven Aspergillose reicht von 43 bis 3950 Kopien (Tabelle 11). Der arithmetische Mittelwert liegt bei 921,8 Kopien (Abbildung 16).

3.3.2.3 Mögliche invasive Aspergillose

Es liegen 54 Bronchiallavagen vor. Davon kann in 11 Proben *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachgewiesen werden. Zwei werden mit je 2 Kopien wie die anderen 41 Proben als negativ bewertet. Von zwei Trachealsekreten misst eins 86 Kopien, das andere ist negativ. In einem Bronchialsekret können 650 Kopien nachgewiesen werden. Von zwei Lungenbiopsaten kann in einem der Nachweis von 107 Kopien erbracht werden. In einem von zwei Pleurapunktaten kann der Nachweis von 200 Kopien erbracht werden. In weiteren drei Proben, darunter zwei Liquorproben und ein Pankreasekret, lässt sich keine *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachweisen.

42 Patienten (30,6%) werden der Gruppe der möglichen invasiven Aspergillose zugeordnet. Innerhalb dieser Gruppe wird bei 14 Patienten (33,3%) ein positives Ergebnis erzielt. Insgesamt kann in 15 von insgesamt 64 getesteten Proben (23,4%) *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachgewiesen werden (Abbildung 15). Der Bereich der relevanten Werte innerhalb der Gruppe der möglichen invasiven Aspergillose reicht von 82 bis 900 Kopien (Tabelle 12). Der arithmetische Mittelwert beträgt in dieser Gruppe 331,6 Kopien (Abbildung 16).

3.3.2.4 Keine invasive Aspergillose

71 Bronchiallavagen werden untersucht. Davon kann in fünf *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachgewiesen werden (340/120/6/56/32 Kopien). Die übrigen, darunter zwei mit jeweils 2 Kopien sind negativ. In allen zehn Pleurapunktaten kann keine relevante *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachgewiesen werden. Das gleiche gilt für alle zehn Liquorproben. In einem von drei Lungenbiopsaten können 10 Kopien nachgewiesen werden. Der Wert wird, da er unter dem Schwellenwert liegt als negativ betrachtet. Das gleiche gilt für eins von zwei Trachealsekreten mit nachgewiesenen 3 Kopien. Die übrigen Proben, darunter ein Bronchialsekret, eine-Aszites-Probe, ein Perikarderguss sowie ein Magenbiopsat bleiben negativ. Mit 57,7% (n=79) ist die Anzahl der Patienten, die hinsichtlich der zu Grunde gelegten Diagnosekriterien nicht von einer invasiven Aspergillose betroffen sind, die größte getestete Gruppe. Hier lässt sich bei fünf von 79 Patienten (6,3%) *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachweisen.

Insgesamt weisen fünf von 103 Proben (4,9%) relevante *Aspergillus-fumigatus*-DNS vor. Weitere sechs Werte (5,8%) bleiben mit einem Mittelwert von 5,4 Kopien deutlich unter dem Schwellenwert. Zusammenfassend kann bei 93,7 % der Patienten, bei denen laut Kriterien keine invasive Aspergillose vorliegt, keine relevante *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachgewiesen werden.

Die Werte in dieser Gruppe liegen in einem Bereich von 32 bis 340 Kopien. Der arithmetische Mittelwert wird mit 121,6 Kopien bestimmt (Abbildung 16).

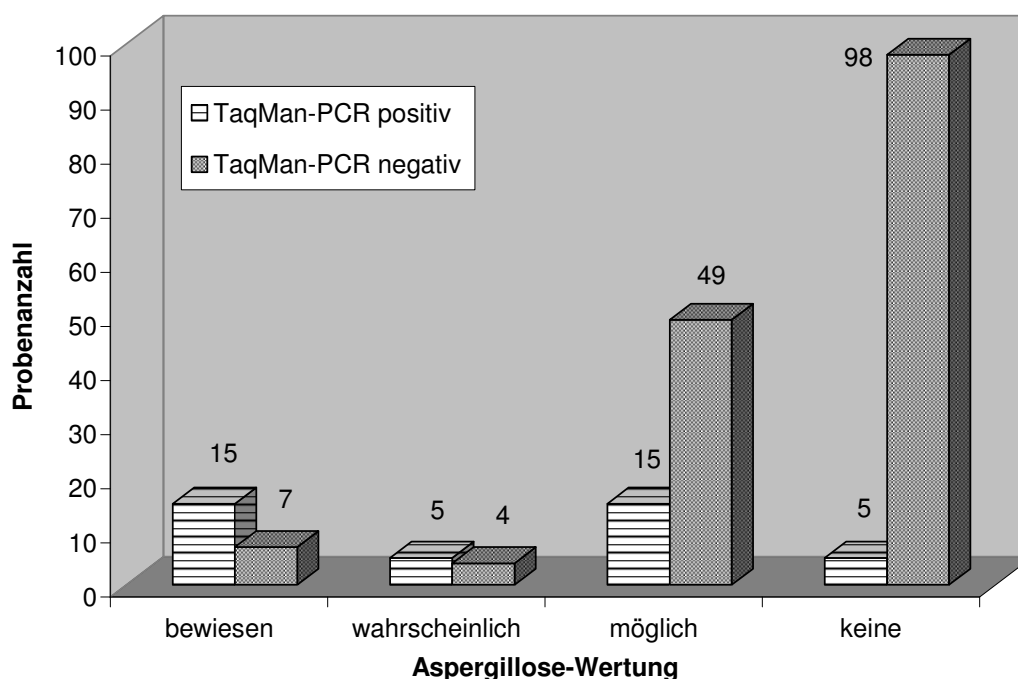


Abbildung 15: Darstellung der TaqMan-Ergebnisse in Bezug auf die Gruppeneinteilung: **bewiesene**, **wahrscheinliche**, **mögliche** und **keine** invasive Aspergillose, Angaben in Bezug auf die Probenanzahl n

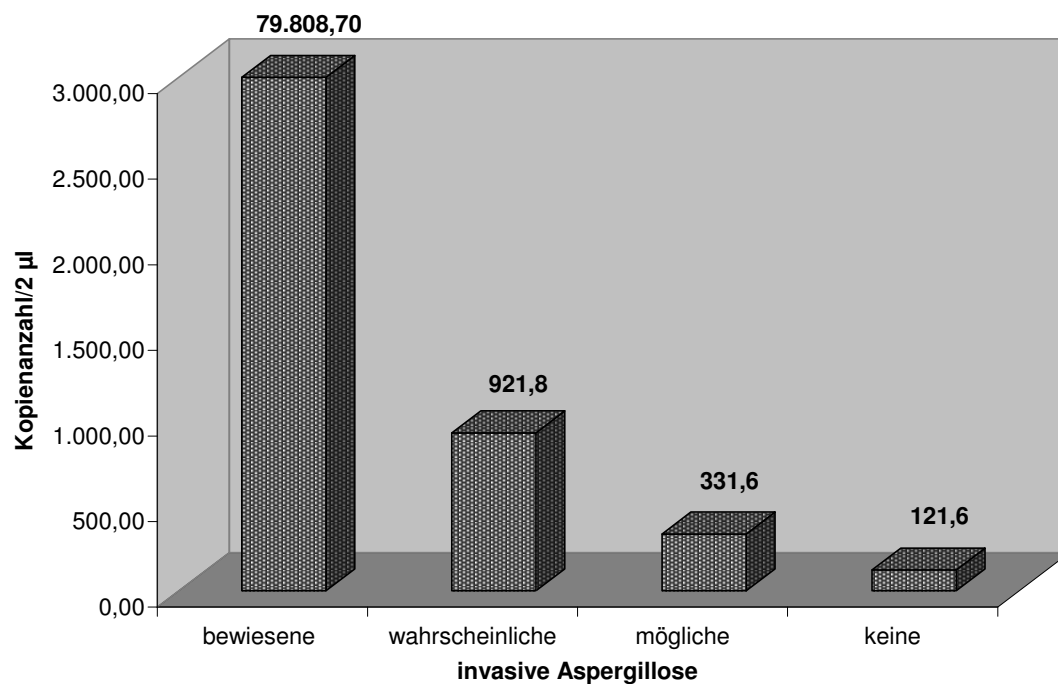


Abbildung 16: Quantitative Ergebnisse innerhalb der einzelnen Patientengruppen: **bewiesene**, **wahrscheinliche**, **mögliche** und **keine** invasive Aspergillose in Bezug auf die positiven Proben

Tabelle 10: Ergebnisse TaqMan-PCR der Patienten mit **bewiesener** invasiver Aspergillose in absteigender Reihenfolge

Nr.	Patienten- kürzel: Initialien, Alter, Geschlecht	Diagnose	Probe	Probe- entnahme, Tag n nach (+) / vor (-) Antimykotika- Gabe (A/V/I- Gabe)	Kopienzahl /2µl (TaqMan- PCR)	Ergebnisse Panfungus- PCR	Kultur (parallel angelegt)
1	GH-80m	NHL	BAL	-3	7.200	++	<i>A.fumigatus</i> <i>C.kefyr</i> <i>C.tropicalis</i>
			Lungenbiopsat	+2	563.000	++	n.a.
			Leberbiopsat	+2	50	-	n.a.
2	HJ-11m	ALL	Liquor	?	520.000	++	n.a.
3	TL-38m	LTX	Trachealsekret	+/-0	92.500	Schmier	<i>A.fumigatus</i>
4	CP-42w	NHL	BAL	+/-0	3.850	+	<i>C.albicans</i>
			Pleurapunktat (aus Sektion)	+/-0	0	-	k.W.
5	RA-54w	Malaria tropica	Trachealsekret	+/-0	3.750	+	<i>A.fumigatus</i> <i>C.glabrata</i> <i>C.tropicalis</i>
			Pleurapunktat	+2	0	-	k.W.

Nr.	Patienten- kürzel: Initialien, Alter, Geschlecht	Diagnose	Probe	Probe- entnahme, Tag n nach (+) / vor (-) Antimykotika- Gabe (A/V/I- Gabe)	Kopienzahl /2µl (TaqMan- PCR)	Ergebnisse Panfungus- PCR	Kultur (parallel angelegt)
(aus Sektion)							
6	KJ-40m	M.Wegener	BAL li	+/-0	2.615	+	<i>A.fumigatus</i>
			BAL re	+/-0	2.650	++	<i>A.fumigatus</i>
			Trachealsekret	+15	56	+	<i>A.fumigatus</i>
			BAL	+17	132	-	k.W.
			BAL li	+18	20	-	k.W.
			BAL re	+18	45	-	k.W.
7	MH-47m	ALL	BAL	+/-0	1.135	+	<i>A.fumigatus</i>
			Lungenbiopsat	+9	112	-	<i>A.fumigatus</i>
8	JH-65m	okuläre Infektion	Hornhaut- abradat re	+/-0	35	n.d.	k.W.
			Hornhaut- abradat li	+/-0	0	n.d.	k.W.
			Kammer-wasser re	+1	11	n.d.	n.a.
			Kammer-wasser li	+1	0	n.d.	n.a.
			Bulbus-oculi- Biopsat	+16	0	n.d.	n.a.

A. = *Aspergillus*

ALL = akute lymphatische Leukämie

A/V/I-Gabe = Amphotericin-B-/Voriconazol-/Itraconazol-Gabe

BAL = Bronchiallavage

C. = *Candida*

k.W: = kein Wachstum

li = links

LTX = Lebertransplantation

NHL = Non-Hodgkin-Lymphom

n.a. = nicht angelegt

n.d. = nicht durchgeführt

re = rechts

Tabelle 11: Ergebnisse TaqMan-PCR der Patienten mit **wahrscheinlicher** invasiver Aspergillose in absteigender Reihenfolge

Nr.	Patienten- kürzel: Initialien, Alter, Ge- schlecht	Diagnose	Probe	Probe- entnahme, Tag n nach (+) / vor (-) Antimykotika- Gabe (A/V/I- Gabe)	Kopienzahl /2µl (TaqMan- PCR)	Ergebnisse Panfungus- PCR	Kultur (parallel angelegt)
9	SC-64w	AML	Trachealsekret	+/-0	3.950	+	<i>A.fumigatus</i>
10	HB-49w	NHL	Trachealsekret	+/-0	350	+	<i>C.albicans</i>
11	KD-41w	NHL	BAL	+/-0	203	-	<i>A.fumigatus</i> <i>C.albicans</i> <i>C.dublinien- sis</i>
12	BJ-69m	Aplasie	BAL	+1	63	+	<i>A.fumigatus</i> <i>C.glabrata</i>
13	SM-48m	NHL	Trachealsekret	+/-0	43	n.d.	k.W.
14	AA-42w	Chronische Granulo- matose	BAL	-8	0	+	<i>A.fumigatus</i> <i>C.albicans</i>
			BAL	-8	0	+	k.W.
15	SE-51m	M. Hodgkin	BAL	-1	4	-	<i>A.fumigatus</i>
16	GS-53m	LTX	Trachealsekret	+2	0	+	<i>A.fumigatus</i>

A. = *Aspergillus*

AML = akute myeloische Leukämie

A/V/I-Gabe = Amphotericin-B-/Voriconazol-/Itraconazol-Gabe

BAL = Bronchiallavage

C. = *Candida*

k.W: = kein Wachstum

li = links

LTX = Lebertransplantation

M. = Morbus

NHL = Non-Hodgkin-Lymphom

n.a. = nicht angelegt

n.d. = nicht durchgeführt

re = rechts

Tabelle 12: Ergebnisse TaqMan-PCR der Patienten mit **möglicher** invasiver Aspergillose in absteigender Reihenfolge

Nr.	Patienten- kürzel (Initialien, Alter, Ge- schlecht)	Diagnose	Probe	Probeentnahme, Tag n nach (+) / vor (-) Antimykotika- Gabe (A/V/I- Gabe)	Kopien- zahl/2µl (TaqMan- PCR)	Ergebnis Panfungus- PCR	Kultur (parallel angelegt)
17	PM-41m	AML	BAL	-2	900	+	k.W.
18	SA-33m	AML	BAL	+/-0	900	+	k.W.
19	JH-76m	NHL	BAL	-1	865	+	k.W.
20	ÜK-21m	NHL	Bronchial- sekret	+/-0	650	+	k.W.
			Liquor	-1	0	-	k.W.
21	SA-52m	CLL	BAL	+/-0	310	+	<i>C.albicans</i>
22	WS-56w	AML	BAL, d1	kein A/V/I	214	-	k.W.
			BAL, d22	kein A/V/I	0	-	k.W.
			BAL li, d142	kein A/V/I	125	+	<i>C.albicans</i>
			BAL re, d142	kein A/V/I	0	+	<i>C.albicans</i>
23	CV- 49m	AML	BAL	+9	200	+	<i>C.kefyr</i>
24	TR-58w	MDS	Pleurapunktat	+/-0	200	+	k.W.
			Pleurapunktat	+/-0	0	-	k.W.
25	WR-44w	AML	BAL	+16	122	-	<i>C.albicans</i>
26	SL-66m	Bronchial- Ca	BAL	kein A/V/I	115	+	<i>C.glabrata</i> <i>C.krusei</i>
27	BF-57m	NHL	BAL	+1	0	-	k.W.
			Lungenbiopsat	+1	107	-	n.a.
28	RR-48w	NHL	BAL	+1	98	+	<i>C.albicans</i>
29	FG-70w	AML	Tracheal-sekret	+1	86	+	<i>C.albicans</i>
30	KB- 36m	AML	BAL	+5	82	(+)	k.W.
31	LR-60m	AML	BAL li	-1	2	n.d.	k.W.
			BAL re	-1	0	n.d.	k.W.
32	UU-56m	Haarzell- Leukämie	BAL re, I	+2	2	-	k.W.
			BAL re, II	+2	0	-	k.W.
33	AA-64m	ALL	BAL	+3	0	-	k.W.
34	BW-63m	Plasmo- zytom	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
35	BF-29w	ALL	BAL li	kein A/V/I	0	+	k.W.
			BAL re	kein A/V/I	0	-	k.W.
			Tracheal-sekret	kein A/V/I	0	+	k.W.
36	BJ-40m	CLL	BAL	+/-0	0	-	<i>C.albicans</i>
37	DK-58m	AML	Lungenbiopsat	+15	0	-	k.W.

Nr.	Patienten- kürzel (Initialien, Alter, Ge- schlecht)	Diagnose	Probe	Probeentnahme, Tag n nach (+) / vor (-) Antimykotika- Gabe (A/V/I- Gabe)	Kopien- zahl/2µl (TaqMan- PCR)	Ergebnis Panfungus- PCR	Kultur (parallel angelegt)
38	EA-61w	CML	BAL	kein A/V/I	0	+	k.W.
39	FD-42m	Sepsis	BAL	+2	0	+	<i>C.albicans</i>
40	FG-81m	Rektum-Ca	Pankreas-sekret	+1	0	-	<i>C.albicans</i>
41	GL-51m	CLL	BAL	+8	0	-	n.a.
			BAL	+8	0	-	k.W.
42	HE-57m	AML	BAL	+/-0	0	+	<i>C.albicans</i>
43	HH-62m	AML	BAL	+2	0	+	k.W.
44	HH-60m	AML	BAL	+2	0	-	k.W.
45	IB-60w	AML	BAL li	-1	0	+	<i>C.albicans</i>
			BAL re	-1	0	-	<i>C.albicans</i>
46	KR-58w	Plasmazell- leukämie	BAL	+1	0	n.d.	k.W.
47	LK-64m	AML	BAL I	+/-0	0	+	<i>C.tropi- calis</i>
			BAL II	+/-0	0	+	<i>C.tropi- calis</i> <i>C.glabrata</i>
48	LO-31m	ALL	Liquor	+1	0	-	n.a.
49	NA-69w	AML	BAL li	+/-0	0	-	<i>C.krusei</i>
			BAL re	+/-0	0	-	<i>C.krusei</i>
50	OG-37w	AML	BAL	+5	0	-	<i>C.albicans</i> <i>C.tropi- calis</i>
			BAL	+5	0	-	<i>C.albicans</i> <i>C.tropi- calis</i>
51	PB-57w	CLL	BAL	+3	0	-	<i>C.glabrata</i>
52	PS-44m	AML	BAL	+13	0	-	k.W.
			BAL	+13	0	-	<i>C.krusei</i>
			BAL	+13	0	-	k.W.
53	PF-35m	NHL	BAL, d1	kein A/VI	0	-	k.W.
			BAL, d8	kein A/VI	0	-	<i>Moraxella</i>
			BAL, d15	kein A/VI	0	+	<i>C.albicans</i>
			BAL, d21	kein A/VI	0	-	<i>Moraxella</i>
			BAL, d24	kein A/VI	0	-	<i>Moraxella</i>
54	PC-32m	ITP	BAL	+3	0	-	k.W.
55	SC-61w	M.Hodgkin	BAL	kein A/VI	0	++	<i>C.albicans</i>
56	SJ-45m	CML	BAL	-2	0	-	k.W.

Nr.	Patienten- kürzel (Initialien, Alter, Ge- schlecht)	Diagnose	Probe	Probeentnahme, Tag n nach (+) / vor (-) Antimykotika- Gabe (A/V/I- Gabe)	Kopien- zahl/2µl (TaqMan- PCR)	Ergebnis Panfungus- PCR	Kultur (parallel angelegt)
57	SJ-51m	NHL	BAL	+2	0	-	k.W.
58	WM-37w	AML	BAL	+5	0	-	<i>C.albicans</i>
			BAL	+35	0	-	k.W.

A.	=	<i>Aspergillus</i>
ALL	=	akute lymphatische Leukämie
AML	=	akute myeloische Leukämie
A/V/I-Gabe	=	Amphotericin-B-/Voriconazol-/Itraconazol-Gabe
BAL	=	Bronchiallavage
C.	=	<i>Candida</i>
Ca	=	Karzinom
CLL	=	chronische Lymphatische Leukämie
CML	=	chronische Myeloische Leukämie
d	=	Tag
ITP	=	idiopathisch thrombozytopenische Purpura
k.W:	=	kein Wachstum
li	=	links
LTX	=	Lebertransplantation
M.	=	Morbus
NHL	=	Non-Hodgkin-Lymphom
n.a.	=	nicht angelegt
n.d.	=	nicht durchgeführt
re	=	rechts

Tabelle 13: Ergebnisse TaqMan-PCR der Patienten mit **keiner** invasiven Aspergillose in absteigender Reihenfolge

Nr.	Patienten- kürzel (Initialien, Alter, Ge- schlecht)	Diagnose	Probe	Probeent- nahme, Tag n nach (+) / vor (-) Antimykotika-Gabe (A/V/I-Gabe)	Kopien- zahl/2µl (TaqMan- PCR)	Ergebnis Panfungus- PCR	Kultur (parallel angelegt)
59	DI-47w	NHL	BAL, d1	kein A/V/I	0	-	k.W.
			BAL, d23	kein A/V/I	340	-	k.W.
			Lungen-biopsat, d23	kein A/V/I	0	-	n.a.
60	SN-54m	Larynx-Ca	BAL	kein A/V/I	120	+	<i>C.albicans</i> <i>C.glabrata</i>
61	MD-65w	Bronchial-Ca	BAL	kein A/V/I	60	-	<i>C.albicans</i>
62	WE-48m	Sepsis	BAL li	kein A/V/I	0	-	k.W.
			BAL re	kein A/V/I	56	+	<i>A.fumigatus</i>
63	BM-31w	CML	BAL, d1	kein A/V/I	32	+	k.W.
			BAL, d26	kein A/V/I	0	-	k.W.
64	KH-42m	HIV	Lungen-biopsat I, d1	kein A/V/I	10	+	<i>C.albicans</i> <i>C.glabrata</i>
			Lungen-biopsat II, d1	kein A/V/I	0	+	<i>C.albicans</i> <i>C.glabrata</i>
			BAL, d36	kein A/V/I	0	+	<i>C.albicans</i>
65	SH-49m	Plasmo- zytom	Liquor, d1	kein A/V/I	8	-	n.a.
			Liquor, d120	kein A/V/I	0	-	n.a.
66	LL-41m	AML	Tracheal-sekret	kein A/V/I	3	n.d.	<i>C.albicans</i>
67	KM-50w	Sarkoidose	BAL	kein A/V/I	2	-	k.W.
68	KR-33m	NHL	BAL	kein A/V/I	2	-	k.W.
69	GB-49m	AML	Pleurapunktat, d1	kein A/V/I	2	-	k.W.
			Pleurapunktat, d50	+15	0	-	k.W.
70	AS-57w	Sarkoido-se	BAL	kein A/V/I	0	-	<i>C.albicans</i> <i>C.glabrata</i>
71	AS-32w	HIV	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
72	BA-22m	AML	Liquor	+3	0	-	k.W.
73	BU-44w	Pneumo-nie	BAL	kein A/V/I	0	+	<i>C.albicans</i>
74	BR-38w	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
75	BR-36m	Hoden-Ca	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.

Nr.	Patienten- kürzel (Initialien, Alter, Ge- schlecht)	Diagnose	Probe	Probeent- nahme, Tag n nach (+) / vor (-) Antimyko- tika-Gabe (A/V/I-Gabe)	Kopien- zahl/2µl (TaqMan- PCR)	Ergebnis Panfungus- PCR	Kultur (parallel angelegt)
76	BJ-53m	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
77	BJ-41w	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
78	BE-49m	CML	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
79	DR-52m	AML	BAL	kein A/V/I	0	+	<i>C.norwegien- sis</i>
80	DJ-71m	NHL	BAL	+9	0	(+)	k.W.
81	EH-51m	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
82	EM-12w	ALL	BAL I, d1	kein A/V/I	0	-	k.W.
			BAL II, d1	kein A/V/I	0	-	n.a.
			BAL, d15	kein A/V/I	0	-	k.W.
			Bronchial- sekret, d21	kein A/V/I	0	-	k.W.
			Perikard-erguss, d28	kein A/V/I	0	-	k.W.
			Liquor, d36	kein A/V/I	0	-	n.a.
			BAL, d37	kein A/V/I	0	-	n.a.
83	FM-22m	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	<i>C.albicans</i>
84	FR-47m	NHL	Liquor	kein A/V/I	0	-	k.W.
85	GZ-79m	TBC	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
86	GJ-66m	NHL	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
87	GW-60m	Plasmo- zytom	BAL	kein A/V/I	0	+	<i>C.albicans</i>
88	HW-41m	NHL	Liquor	kein A/V/I	0	-	n.a.
89	HR-59w	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	n.a.
90	HT-35m	Sarkoidose	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
91	HM-33w	Cervix-Ca	BAL	kein A/V/I	0	+	<i>C.albicans</i>
92	HH-51w	AML	BAL	kein A/V/I	0	n.d.	k.W.
93	HU-19w	M.Hodgkin	BAL	kein A/V/I	0	+	<i>C.albicans</i>
94	HR-67m	AML	BAL	kein A/V/I	0	+	<i>C.albicans</i>
95	HA-44w	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
96	HD-63m	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
97	ID-56w	AML	Pleurapunktat	kein A/V/I	0	-	k.W.
98	JG-69m	CLL	BAL	kein A/V/I	0	+	<i>C.albicans</i>
99	JH-72m	TBC	BAL	kein A/V/I	0	-	<i>C.albicans</i>
100	KR-59w	AML	Pleurapunktat, d1	kein A/V/I	0	n.d	k.W.
			Pleurapunktat, d10	kein A/V/I	0	n.d	k.W.

Nr.	Patienten- kürzel (Initialien, Alter, Ge- schlecht)	Diagnose	Probe	Probeent- nahme, Tag n nach (+) / vor (-) Antimyko- tika-Gabe (A/V/I-Gabe)	Kopien- zahl/2µl (TaqMan- PCR)	Ergebnis Panfungus- PCR	Kultur (parallel angelegt)
			BAL, d16	kein A/V/I	0	n.d.	k.W.
			Pleurapunktat, 16	kein A/V/I	0	n.d.	k.W.
			BAL, d60	kein A/V/I	0	n.d.	k.W.
101	KC-36m	NHL	Liquor	kein A/V/I	0	-	n.a.
102	KW-42m	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	n.a.
103	KW-44m	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
104	KA-60m	Plasmo- zytom	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
105	KH-66m	AML	BAL	kein A/V/I	0	+	k.W.
106	KR-35m	Sepsis	Aszites	kein A/V/I	0	-	<i>C.albicans</i>
107	LS-48m	AML	BAL	kein A/V/I	0	(+)	k.W.
108	LK-48m	NHL	Magen-biopsat	kein A/V/I	0	n.d.	n.a.
109	LT-45m	AML	BAL	kein A/V/I	0	(+)	k.W.
110	LF-56m	AML	BAL	kein A/V/I	0	(+)	k.W.
111	MH-66m	AML	Pleurapunktat, d1	kein A/V/I	0	+	k.W.
			BAL, d9	kein A/V/I	0	+	k.W.
			Pleurapunktat, d 106	kein A/V/I	0	-	k.W.
112	MK-56m	Plasmo- zytom	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
113	MK-39w	Sarkoidose	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
114	MG-43m	NHL	Liquor, d1	kein A/V/I	0	-	n.a.
			Liquor, d5	kein A/V/I	0	-	n.a.
115	MK-43w	AML	Pleurapunktat	kein A/V/I	0	-	n.a.
116	MV-44m	AML	BAL	kein A/V/I	0	+	<i>C.krusei</i>
117	NM-55w	Bronchial-Ca	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
118	OH-63w	AML	BAL	kein A/V/I	0	n.d.	k.W.
119	PH-47m	Sarkoidose	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
120	PA-73m	AML	BAL, d1	kein A/V/I	0	-	k.W.
			BAL, d25	kein A/V/I	0	-	k.W.
121	RH-45w	Pneumonie	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
122	RG-44m	Plasmo- zytom	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
123	RE-52m	AML	BAL I	kein A/V/I	0	n.d.	k.W.

Nr.	Patienten- kürzel (Initialien, Alter, Ge- schlecht)	Diagnose	Probe	Probeent- nahme, Tag n nach (+) / vor (-) Antimyko- tika-Gabe (A/V/I-Gabe)	Kopien- zahl/2µl (TaqMan- PCR)	Ergebnis Panfungus- PCR	Kultur (parallel angelegt)
			BAL II	kein A/V/I	0	n.d.	k.W.
			BAL III	kein A/V/I	0	n.d.	k.W.
124	SR-41m	CML	BAL	kein A/V/I	0	+	<i>C.albicans</i>
125	SI-46m	NHL	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
126	SK-34w	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	n.a.
127	SG-63m	Magen-Ca	BAL	kein A/V/I	0	-	n.a.
128	SB-65w	AML	Pleurapunktat	kein A/V/I	0	-	k.W.
129	SG-41w	AML	Tracheal-sekret	kein A/V/I	0	+	<i>C.glabrata</i>
130	SS-37w	NHL	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
131	SL-44m	CML	BAL	kein A/V/I	0	-	<i>C.albicans</i>
132	TJ-51m	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
133	TC-38w	Sepsis	Liquor	kein A/V/I	0	-	n.a.
134	WH-59m	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
135	WP-79m	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	k.W.
136	ZG-59m	AML	BAL	kein A/V/I	0	+	<i>C.albicans</i>
137	ZA-50w	AML	BAL	kein A/V/I	0	-	n.a.

A.	=	<i>Aspergillus</i>
ALL	=	akute lymphatische Leukämie
AML	=	akute myeloische Leukämie
A/V/I-Gabe	=	Amphotericin-B-/Voriconazol-/Itraconazol-Gabe
BAL	=	Bronchiallavage
C.	=	<i>Candida</i>
Ca	=	Karzinom
CLL	=	chronische lymphatische Leukämie
CML	=	chronische myeloische Leukämie
d	=	Tag
HIV	=	human immunodeficiency virus
ITP	=	idiopathisch thrombozytopenische Purpura
k.W:	=	kein Wachstum
li	=	links
LTX	=	Lebertransplantation
M.	=	Morbus
n.d.	=	nicht durchgeführt
NHL	=	Non-Hodgkin-Lymphom
n.a.	=	nicht angelegt
re	=	rechts
TBC	=	Tuberkulose

3.3.3 Panfungus-PCR

Die zum Vergleich bei 90,2% (n=184) Proben parallel durchgeführte Panfungus-PCR zeigt bei 36 von 140 Proben die negativ in der TaqMan-PCR sind, ein positives Ergebnis. In drei Proben lässt sich parallel kulturell ein *Aspergillus fumigatus* nachweisen. In 18 Proben kann ein isolierter *Candida*-Wachstum nachgewiesen werden, davon sind 14 der Spezies der *Candida albicans* zugehörig. Bei den übrigen vier handelt es sich um andere *Candida*-Spezies (Tabelle 10 bis Tabelle 13). Einmal wird ein *Candida-albicans*-Wachstum zusätzlich zum *Aspergillus-fumigatus*-Wachstum beschrieben. Bei drei Proben wachsen zwei verschiedene *Candida*-Spezies.

3.3.4 Darstellung einzelner Patienten im Verlauf

3.3.4.1 Patient Nr. 6 (KJ-40m)

Als Beispiel für einen quantitativen Verlauf wird ein Patient (siehe Patient 6, Tabelle 10 und Abbildung 17) herangezogen, von dem insgesamt sechs Proben zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden können. Patient, männlich, 40 Jahre:

- Dezember 1999: Erstdiagnose einer Wegener-Granulomatose, Mitte Januar 2000: Beginn Cyclophosphamid-Therapie (entspricht Zeitpunkt Woche 0 in der graphischen Darstellung).
- Ende Januar anhaltende Neutropenie, erste klinische Auffälligkeiten (pulmonale Beschwerden), Bildgebung: Im Röntgen Thorax Infiltrate, HR-CT: Rundherde, histologischer Nachweis von *Aspergillus fumigatus* nach Bronchoskopie, zu diesem Zeitpunkt liegt keine Probe für eine TaqMan-PCR vor.
- Zunächst Besserung unter Breitband-Antibiose, Mitte Februar erneute Verschlechterung (klinisch und radiologisch), erneute Bronchoskopie, Beginn Antimykotikum-Gabe, Beatmung für vier Wochen.
- Nach mehreren Wochen langsame klinische und radiologische Besserung (Entlassung aus dem Krankenhaus im Juni 2000).

3.3.4.2 Patient Nr. 1 (GH-80m)

Bei Patient 1 (Tabelle 10, Abbildung 16) handelt es sich um einen Patienten, der innerhalb von 14 Tagen an einer fulminanten invasiven Aspergillose verstorben ist:

Patient, männlich, 80 Jahre:

- August 1999: Erstdiagnose eines großzelligen B-Non-Hodgkin-Lymphoms (B-NHL) im Stadium IV. Am 1. Dezember 1999 erfolgt die stationäre Aufnahme mit neutropenem Fieber nach dem vierten Zyklus Chemotherapie (entspricht Tag 0 in der graphischen Darstellung), klinisch bestehen Thoraxschmerzen und Dyspnoe und Fieber, im Röntgen-Thorax zeigt sich ein Infiltrat rechts.
- Innerhalb der nächsten Tage weitere Verschlechterung, im HR-CT (High-Resolution-Computertomographie) am 9.12.1999: Rundherde.
- Trotz antimykotischer Therapie verstirbt der Patient am 14.12.1999. Histologisch kann post mortem eine invasive Aspergillose aus den Lungen-Rundherden und den Leberherden gesichert werden.

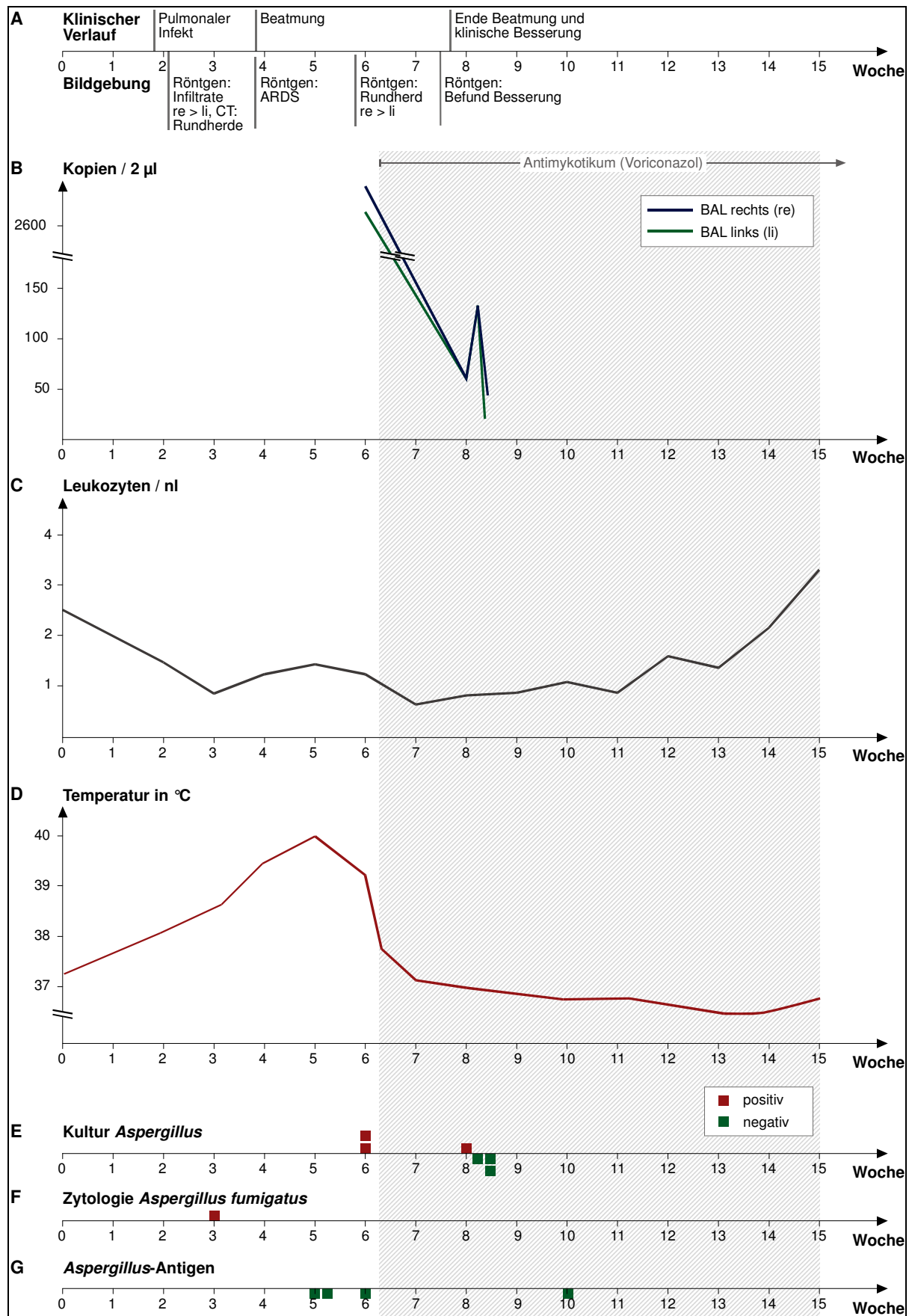


Abbildung 17: Verlauf Patient Nr. 6, m, 40 Jahre, Hauptdiagnose: Morbus Wegener, bewiesene invasive Aspergillose

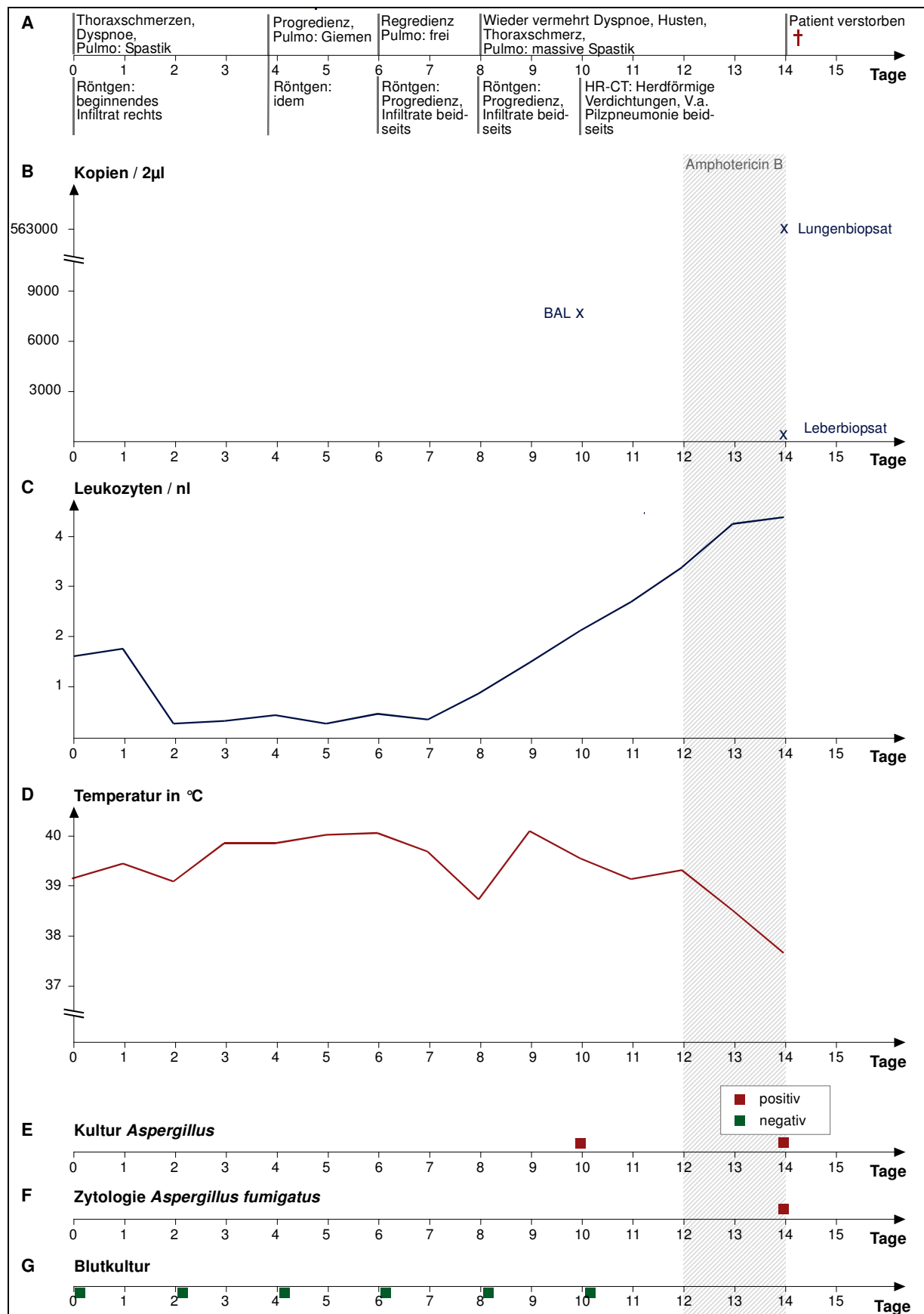


Abbildung 18: Patient Nr. 1: männlich, 80 Jahre, Hauptdiagnose: Non-Hodgkin-Lymphom, verstorben am 14.Dezember 1999 an einer fulminanten invasiven Aspergillose.

3.4 Testvalidität/Resultatvalidität

Für die Beurteilung der Validität der in dieser Arbeit vorgestellten Methode, werden die Patientengruppen der bewiesenen, der wahrscheinlichen und möglichen invasiven Aspergillose sowie die Gruppe nicht an invasiver Aspergillose erkrankt einbezogen. Auf Grund der nur unsicheren Aussage hinsichtlich einer Aspergillose-Erkrankung in der Gruppe der möglichen Aspergillose, werden die Berechnungen unter Einschluss und unter Ausschluss dieser Patientengruppe vorgenommen und die Ergebnisse tabellarisch gegenübergestellt (Tabelle 14).

3.4.1 Diagnostische Sensitivität

Eine hohe diagnostische Sensitivität liegt vor, wenn mit der Methode viele Kranke als krank erkannt werden. Unter Betrachtung der drei oben angegebenen Patientengruppen liegt eine Sensitivität von 81,3% vor. Erfolgt die Betrachtung nur unter Einbeziehung der Patienten mit bewiesener Aspergillose, so liegt die Sensitivität bei 100%. Eine Sensitivität von 46,6% liegt vor, wenn alle Patientengruppen einbezogen werden (Tabelle 14).

3.4.2 Diagnostische Spezifität

Eine Methode zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus, wenn mit ihr möglichst viele Nichtkranke als solche erkannt werden. Unter Einbeziehung der in Kapitel 3.4 angegebenen Patientengruppen kann eine Spezifität von 93,7% erreicht werden. Bei Ausschluss der Patienten mit wahrscheinlicher invasiver Aspergillose, bzw. mit möglicher invasiver Aspergillose ändert sich das Ergebnis nicht.

3.4.3 Positiver prädiktiver Wert

Der positive prädiktive Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Patient tatsächlich an einer invasiven Aspergillose erkrankt ist, wenn er ein positives Testergebnis vorweist. Werden alle Patientengruppen betrachtet, liegt ein positiver prädiktiver Wert von 84,4% vor. Unter Ausschluss der Patientengruppe mögliche invasive Aspergillose lässt sich ein positiver prädiktiver Wert von 72,2% ermitteln. Wird die Gruppe der wahrscheinlichen invasiven Aspergillose ebenfalls ausgeschlossen, so sinkt er auf 61,5%.

3.4.4 Negativer prädiktiver Wert

Der negative prädiktive Wert gibt die bedingte Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Patient bei einem negativen Testergebnis tatsächlich nicht erkrankt ist. Er liegt bei 70,5% unter Einbeziehung aller Patientengruppen, bei 96,1% unter Ausschluss der Patientengruppe der möglichen Aspergillose. Bei zusätzlichem Ausschluss der wahrscheinlich invasiven Aspergillose kann der negative prädiktive Wert mit 100% angegeben werden.

Tabelle 14: Darstellung der diagnostischen Gütekriterien unter Einschluss und Ausschluss der Patientengruppe mit wahrscheinlicher und möglicher invasiver Aspergillose

Zusammensetzung der berechneten Patientengruppen				
		b + w + m + k	b + w + k	b + k
		n(ges) = 137	n(ges) = 95	n(ges) = 87
Diagnostische Gütekriterien	Sensitivität	46,60%	81,30%	100%
	Spezifität	93,70%	93,70%	93,70%
	PPW	84,40%	72,20%	61,50%
	NPW	70,50%	96,10%	100%

- b** = **bewiesene** invasive Aspergillose (n=8)
k = **keine** invasive Aspergillose (n=79)
m = **mögliche** invasive Aspergillose (n=42)
w = **wahrscheinliche** invasive Aspergillose (n=8)
NPW = negativer prädiktiver Wert
PPW = positiver prädiktiver Wert

4 Diskussion

4.1 Patienteneinteilung

Sämtliche untersuchten Patienten wurden zur Evaluierung nach den von Ascioglu et al. [35] aufgestellten Kriterien in die Kategorie der bewiesenen, wahrscheinlichen, möglichen oder keinen invasiven Aspergillose eingeordnet. Dazu wurden die Kriterien hinsichtlich der Spezifizierung für den *Aspergillus-fumigatus*-Nachweis abgeändert. Diese Kriterien wurden 2002 als Gemeinschaftsarbeit von der EORTC/IFICG und von der National Institute of Allergy and Infectious Mycoses Study Group aufgestellt. Ziel dieser Einteilung von Patienten in definierte Gruppen, ist die Verbesserung der klinischen Forschung auf dem Gebiet der invasiven Mykosen durch einheitliche vergleichbare Maßstäbe. Bei der Einteilung der Patienten in der vorliegenden Arbeit fiel auf, dass zwischen den beiden Gruppen der bewiesenen und der wahrscheinlichen invasiven Aspergillose und den beiden Gruppen der möglichen und der nicht an invasiver Aspergillose Erkrankter, ein deutliches Ungleichgewicht zugunsten der letzten beiden Gruppen festgestellt werden konnte. Viele Patienten wurden aufgrund fehlender, oft schwer zu erhaltener, mikrobiologischer und histologischer *Aspergillus*-Nachweise in die Stufe der möglichen Aspergillose eingeteilt. Bei nur wenigen kann die invasive Aspergillose nachgewiesen werden. Ungleiche Gruppengrößen bergen den Nachteil, dass geringfügige Veränderungen innerhalb der anzahlmäßig kleinen Gruppen, große Auswirkungen auf die diagnostische Auswertung einer Methode haben können (Kapitel 4.3). Das hat zur Folge, dass ein klinischer Vergleich verschiedener Methoden schwer zu bewerten ist, auch wenn die vorherige Einteilung der Patienten nach einem einheitlichen Schema vorgenommen wurde. Subirà et al. [60] überprüft die von Ascioglu et al. [35] aufgestellten Kriterien an Hand von 22 Patienten, bei denen in der Autopsie eine invasive Aspergillose nachgewiesen werden konnte. Von diesen Patienten wurden im Vorfeld zwei der bewiesenen, sechs der wahrscheinlichen und 13 der möglichen invasiven Aspergillose zugeordnet. Diese Publikation verdeutlicht die in der Einleitung beschriebenen Schwierigkeiten, eine invasive Aspergillose prae mortem zu erkennen.

4.2 Molekularbiologische Diagnostik

4.2.1 DNS-Extraktionsverfahren

In der Literatur werden viele Extraktionsmethoden beschrieben wie sich die stabile Zellwand der *Aspergillen* durchbrechen lässt. Die verschiedenen Methoden beruhen auf der mechanischen, chemischen, enzymatischen oder thermischen Lyse der Zellwand. Dabei werden im Allgemeinen mehrere Verfahren kombiniert. So setzt Haynes et al. [61] ein chemisch-toxisches Verfahren unter der Verwendung von Phenol und Chloroform ein. Einsele [62], Sandhu [50] and Williamson et al. [63] beschreiben die Methode der Kombination aus chemischer und enzymatischer Lyse. Dabei wird unter Einwirkung von Proteinase K und Zymolase sowie weiteren chemischen Reagenzien eine Zerstörung der Pilzwände erreicht. Einsele et al. [62] ergänzte das Verfahren um eine alkalische Behandlung mit Natriumhydroxid. Der zeitliche und materielle Aufwand dieser Methoden ist durch eine Vielzahl an Wasch- und Lyseschritten hoch. Zudem findet häufig der Einsatz toxischer Reagenzien statt. Zusätzlich bergen häufige Wechsel und häufiges Öffnen der Reaktionsgefäße die Gefahr der Kontamination [64]. Vergleichsversuche mit einem erweiterten enzymatisch-chemischen Extraktionsverfahren (Dynabeads, Kapitel 3.2.1) wurden durchgeführt. Die Dynabeads bringen zwar einen Zeitvorteil gegenüber der reinen enzymatisch-chemischen Methode, jedoch kann mit einer Nachweisgrenze mit umgerechnet 10^4 KBE/ml in der vorliegenden Arbeit keine zufriedenstellende Sensitivität erreicht werden [55].

Beschriebene mechanische Verfahren beinhalten die Zerstörung der Zellwände entweder durch sterile Glaskügelchen oder durch eine kommerziell hergestellte aus festen Bestandteilen bestehende Matrix [56]. Das Ziel ist, die stabile Zellwand der *Aspergillen* durch die Einwirkung physikalischer Kräfte in Kombination mit einem Lysepuffer zu Durchbrechen. Trotz zusätzlicher Wasch- und Lyseschritte besteht dieses Kombinationsverfahren aus weniger Arbeitsschritten, so dass der zeitliche und materielle Aufwand geringfügiger ist. Die Kontaminationsgefahr wird durch weniger Arbeitsschritte herabgesetzt. Die Glaspartikel-Methode („glassbeads“) wird von Hopfer [48], Hayette [65], Rantakokko-Jalava [76], Tang [66] und Yamakami [67] et al. angewendet. Dabei kann Rantakokko-Jalava et al. durch die einminütige Vorbehandlung der Proben mit „glassbeads“ die Sensitivität der anschließenden Phenol-Chloroform-Extraktion verbessern (Kapitel 4.2.2). Die Anwendung einer kommerziell hergestellten Matrix zur Zerstörung der Zellwände wird 1998 von Müller et al. [56] publiziert. Er kann mit seiner Methode im Vergleich mit der Phenol-Chloroform-Extraktion eine mehr als doppelt so hohe DNS-Ausbeute für den *Aspergillus fumigatus* nachweisen (29,9µl/ml versus 10,2µl/ml aus 10^7 KBE/ml). Dabei werden mittels Einsatz einer Lysing Matrix und Bearbeitung der Proben im FastPrep cell disrupter durch die Einwirkung von Scherkräften, die Zellwände aufgespalten. Eine Sensitivitätsbestimmung wird nicht durchgeführt. Die zusätzliche Schnelligkeit dieser Methode, mit der zwölf Proben innerhalb einer Stunde extrahiert werden können und der damit verbundene geringere Arbeitsaufwand im Gegensatz zu anderen Extraktionsmethoden (Phenol-Chloroform mindestens 4h, Dynabeads 2,5h, Qiagen 3h) führte, neben der hohen Effizienz der DNS-Ausbeute, zu der Entscheidung, das hier eingesetzte Extraktionsverfahren nach dieser Methode durchzuführen. Verschiedene Kombinationen der Lysing Matrix wurden getestet. Dabei erwies sich nur eine Kombination („Sphere und Garnet“) als geeignet, *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachzuweisen. Zusätzlich erfolgte eine Verlängerung der mechanischen Behandlung im FastPrep cell disrupter durch zweimalige Wiederholung des Vorganges sowie eine Verstärkung der einwirkenden Scherkräfte durch Erhöhung der Geschwindigkeit bis auf ein Maximum von 5,5m/s. Beides führt zu einer Erhöhung der DNS-Ausbeute (Abbildung 11). Zum Nachweis der unteren Detektionsgrenze wurden Verdünnungsreihen getestet.

4.2.2 Sensitivität

Die Angabe von kolonie-bildenden Einheiten (KBE) bei den *Aspergillen* aufgrund ihres flächenhaften Wachstums ist schwierig [4]. Zur Bestimmung der Konzentration wird eine vorher homogenisierte Suspension mit enthaltenem *Aspergillus*-Mycel photometrisch auf einen McFarland-Faktor abgeglichen und dann in KBE umgerechnet [68]. Aus der Angabe „kolonie-bildende Einheiten“ kann die Menge an genomischer DNS abgeschätzt werden [68]. Problematisch gestaltet sich die Homogenisierung des Mycels in der physiologischen Kochsalzlösung, um einen genauen Wert der optischen Dichte zu erhalten. Durch das Vorhandensein noch kleinster Partikel kann je nach Messungszeitpunkt eine andere optische Dichte bestimmt werden, so dass es zu Schwankungen der Werte zwischen den folgenden Verdünnungsreihen kommen kann. Dieser Problematik wird versucht, durch ausgiebiges Zermörsern, entgegen zu gehen. Letztendlich müssen diese Schwierigkeiten und damit verbundenen Schwankungen beim Auswerten einer Verdünnungsreihe berücksichtigt werden. Da weder für die Erstellung von *Aspergillus*-spezifischen Verdünnungsreihen, noch für die Extraktion standardisierte Vorgaben existieren und die Extraktion schwierig ist, existieren wenig vergleichbare Angaben in der Literatur. Ein Vergleich mit anderen Autoren ist kritisch zu betrachten. Aufgrund der einfacheren Homogenisierung werden Verdünnungsreihen häufig mit *Candida albicans* durchgeführt. Loeffler et al. [55] verglich 1997 Sensitivitäten von fünf verschiedenen Extraktionsverfahren mit der hausinternen enzymatisch-chemischen Methode. Die dafür verwendeten Verdünnungsreihen wurden aus *Candida albicans*-Suspensionen gewonnen. Es konnten Sensitivitäten von 1 bis 10^3 KBE/ml nachgewiesen werden. Die hauseigene Methode und der QIAmp Tissue Kit (Qiagen) wurden mit 1 bis 10^1 KBE/ml, die Dynabeads mit 10^2 KBE/ml publiziert. Rantakokko-Jalava et al. verglich 2003 verschiedene Extraktionsmethoden, darunter die Phenol-Chloroform-Extraktion. Als Ausgangsmaterial diente eine *Aspergillus fumigatus*-Suspension. Die erreichte Sensitivität wird von 10^2 bis 10^5 KBE/ml angegeben. Hier lag die Sensitivität des Qiagen-Kits bei 10^4 KBE/ml. Die klassische Phenol-Chloroform-Extraktion wurde ohne Vorbehandlung mit Glaskügelchen mit 10^3 KBE/ml, nach einminütiger Vorbehandlung mit 10^2 KBE/ml publiziert. Costa et al. [74] und Loeffler et al. [69] publizierten 2002 ein automatisiertes Extraktionsverfahren mit dem MagNA Pure LC System mit anschließender real-time-PCR im LightCycler. Für dieses Verfahren kann Loeffler et al. [69] eine Detektionsgrenze von 1 KBE/ml für *Aspergillus fumigatus* nachweisen.

Die Sensitivität der hier vorgestellten Extraktionsmethode liegt für die Extraktion von *Aspergillus fumigatus* bei einer unteren Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml. Verglichen mit den hier angegebenen Daten ist die Grenze sehr niedrig. Angaben in der Literatur mit dem FastPrep cell disrupter zur Sensitivitätsbestimmung aus Verdünnungsreihen von *Aspergillus fumigatus* liegen nicht vor und können daher nicht angegeben werden. Die Frage ist, ob sich das Erreichen einer sehr niedrigen Sensitivitätsstufe hinsichtlich der Untersuchung von Bronchiallavagen nachteilig auswirken kann. Durch den Nachweis kleinster DNS-Mengen besteht die Gefahr, viele Patienten mit nur geringfügiger *Aspergillus fumigatus*-Besiedlung nachzuweisen. Da der *Aspergillus* in Form von Sporen ubiquitär in unserer Umgebung vorkommt und er von Gesunden und Kranken gleichermaßen inhaliert wird, könnten diese Keimmengen ausreichen, um einen *Aspergillus fumigatus*-DNS-Nachweis zu erbringen, obwohl keine Erkrankung vorliegt. Es könnte somit eine hohe Anzahl an falsch-positiven Befunden provoziert werden. In der vorliegenden Arbeit liegt die Rate an falsch-positiven Befunden bei 4,3% (5/105 Proben) und ist damit verhältnismäßig niedrig (Kapitel 4.3), so dass sich der hier vermutete Nachteil in der Detektion kleinster DNS-Mengen innerhalb der untersuchten Patienten nicht bestätigt. Sollte eine Erweiterung des Verfahrens auf die Untersuchung von Blutproben erfolgen, so erweist sich eine sehr niedrige Detektionsgrenze als äußerst sinnvoll, da

die Pilzlast im Blut bei Patienten mit histologisch gesicherter Aspergillose von Loeffler et al. [68] mit 1 bis 10KBE/ml Blut beschrieben wird. Die Sensitivitätsgrenze in der hier vorliegenden Arbeit erscheint für die klinische Arbeit in einem anwendbaren Bereich zu liegen. Weitere Sensitivitätsbestimmungen mit anderen Pilzstämmen und aus anderen Probenmaterialien sollten zu Erweiterung erfolgen.

4.2.3 TaqMan-PCR

Die Durchführung einer real-time-PCR mit der Möglichkeit der Quantifizierung des Ergebnisses für den Nachweis von *Aspergillus*-DNS wird in den letzten Jahren vermehrt angewendet [68,70,71,72,73,74,75,76,78,77]. Einer der Hauptvorteile dieser Methode ist die Verminderung falsch-positiver Ergebnisse, die auf eine Kontamination mit vorangehenden amplifizierten PCR-Produkten zurückzuführen ist. Durch das nicht mehr notwendige Öffnen der Reaktionsgefäße nach Amplifikation, wird die Gefahr der Carry-over-Kontamination an dieser Stelle deutlich reduziert. In der vorliegenden Arbeit konnte von insgesamt 34 Läufen, zweimal eine isolierte Kontamination einer Negativkontrolle beobachtet werden. Ob es sich bei den insgesamt fünf falsch-positiven von insgesamt 105 Proben um Kontaminationen oder Kolonisationen handelt, kann letztendlich nicht entschieden werden. Der andere Vorteil gegenüber der konventionellen PCR ist die Quantifizierbarkeit der Ergebnisse. Einer der wichtigsten Punkte nach Erhalt des quantitativen Wertes ist die Aussagekraft dieses Wertes. Damit verbunden sind die Fragen, ob die Höhe des Wertes mit der Schwere der Erkrankung korreliert, ob sich an Hand der Veränderung der Werte das Anprechen einer antimykotischen Therapie kontrollieren lässt und ob zwischen vermuteter Kolonisation und Infektion unterschieden werden kann. In den hier durchgeführten Untersuchungen lässt sich ein Trend unter den Gruppen abzeichnen. Danach ist die größte Menge an *Aspergillus-fumigatus*-DNS in der Gruppe der bewiesenen invasiven Aspergillose gemessen worden. Schwieriger wird die Differenzierung innerhalb der anderen drei Gruppen, da die Unterschiede zwischen den Werten weitaus geringer sind. Die Werte innerhalb der Erkrankung an einer möglichen Aspergillose liegen mehrfach über denen der Gruppe der wahrscheinlichen invasiven Aspergillose. Klare Grenzen lassen sich nicht ziehen. Eine eventuelle Kolonisation in der Gruppe der nicht an invasiver Aspergillose erkrankten Patienten lässt sich allein an Hand der Höhe eines positiven Wertes nicht bestimmen. Über die gleiche Schwierigkeit, an Hand der Höhe der Werte zwischen Kolonisation und Infektion zu unterscheiden, berichtet Rantakokko-Jalava et al. [76]. Bowman et al. [70] weist 2003 im Mausmodell *Aspergillus-fumigatus*-DNS mittels TaqMan-PCR nach. Dabei werden Mäuse mit disseminierter Aspergillose antimykotisch behandelt. Nach antimykotischer Behandlung kann eine Rückläufigkeit der zuvor gemessenen *Aspergillus-fumigatus*-DNS in Gewebeproben der Niere nachgewiesen werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte ein Rückgang der Werte nach antimykotischer Therapie bei einem Patienten beobachtet werden. Dabei handelte es sich um die Untersuchung von Bronchiallavagen. Bei der äußerst geringen Anzahl an fortlaufenden Proben eines Patienten, kann über die Zuverlässigkeit, mit der eine antimykotische Therapie auf diesem Weg kontrolliert werden könnte, jedoch keine sichere Aussage gemacht werden. Die fehlende Anzahl fortlaufender Proben sind dadurch bedingt, dass die notwendigen Untersuchungen wie Bronchoskopie oder z. B. die Punktion seröser Höhlen risikoreich und wenn überhaupt, nur einmal, aber sehr selten mehrmals durchführbar sind. Um weitere Aussagen treffen zu können, sind Untersuchungen einer größeren Patientengruppe und die Untersuchung fortlaufender Proben (wie z. B. Blutproben) erforderlich.

4.2.4 Primer- und Sondenauswahl, Spezifität

Der *Aspergillus-fumigatus* ist der am weitesten verbreitetste Erreger der invasiven Aspergillose [1]. Da das Anlegen von Kulturen kein verlässlicher und ein langwieriger Vorgang ist, wird in dieser Arbeit die Spezifizierung des *Aspergillus-fumigatus* mittels TaqMan-PCR durch Einführung eines speziellen Primerpaares, in dessen Amplifikat eine gewählte Sonde ansetzt, vorgenommen. Brandt et al. [78] ermittelt 1998 mittels Durchführung einer RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) *Aspergillus fumigatus* spezifische Gensequenzen und konstruiert ein Primerpaar, das in einer dieser Sequenzen ansetzt und das ein *Aspergillus-fumigatus*-spezifisches Fragment von 864 Basenpaaren amplifiziert. Das in der vorliegenden Arbeit angewandte Primerpaar setzt an einer dieser spezifischen Gensequenzen an und amplifiziert ein aus 212 Basenpaaren bestehendes Fragment. Dabei werden die Primer als spezifisch für verschiedene *Aspergillus-fumigatus*-Stämme getestet. Aufgrund der Vielfalt an *Aspergillus*-Spezies, auch innerhalb der Gruppe der *Aspergillus-fumigatus*-Gruppe, kann wegen der nur begrenzten Auswahl an im Labor zur Verfügung stehender Stämme, die Aussage über die Spezifität lediglich für diese Auswahl getroffen werden.

Die Frage ist, ob hinsichtlich der Anwendung in der klinischen Diagnostik, die hier gewählte Spezifität ein zu enges Erregerspektrum erfasst. Hayette und Tang et al. [65, 66] erfassten zusätzlich zum *Aspergillus fumigatus* den *Aspergillus flavus*. Von insgesamt über 200 Patienten ließ sich bei zwei Patienten (Bronchiallavagen) kulturell ein *Aspergillus flavus* nachweisen. In der PCR ließ sich einmal jedoch nur ein *Aspergillus flavus* nachweisen. Spiess et al. [79] untersuchte zwölf Bronchiallavagen von elf Patienten mit bewiesener oder wahrscheinlicher invasiver Aspergillose mittels LightCycler-PCR. Dazu werden ein Primerpaar und eine *Aspergillus-fumigatus*-spezifische Sonde eingesetzt. Bei allen untersuchten Proben ließ sich *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachweisen. Spreadbury et al. [80] konnte bei insgesamt drei bestätigten invasiven Aspergillosen, dreimal *Aspergillus-fumigatus*-DNS mittels PCR unter Einsatz eines *Aspergillus-fumigatus*-spezifischen Primerpaares, in Bronchiallavagen nachweisen.

In der klinischen Diagnostik einer invasiven Aspergillose erscheint der spezifische Nachweis von *Aspergillus-fumigatus*-DNS als sinnvoll, da in der Literatur wiederholt der *Aspergillus fumigatus* als Hauptverursacher dieser Erkrankung nachgewiesen kann. Eine Erweiterung der Diagnostik hinsichtlich des Nachweises von anderen *Aspergillus*-Spezies sollte jedoch erwogen werden. Problematisch gestaltete sich die Bewertung bei ausbleibendem Nachweis der *Aspergillus-fumigatus*-DNS, verbunden mit nicht eindeutigen Begleitbefunden eines Patienten, wie es in der Gruppe der möglichen invasiven Aspergillose vorkommt. Hier könnte der Nachweis eines noch breiteren Erregerspektrums zur weiteren Diagnosefindung beitragen. In der vorliegenden Arbeit wurde zu 91% parallel eine Panfungus-PCR durchgeführt. Hierbei zeigt sich, dass jede vierte Probe (25,7%), die in der TaqMan-PCR negativ ist, einen positiven Wert in der Panfungus-PCR aufweist. In der parallel angelegten Kultur ließ sich in über 50% der Fälle *Candida*-Spezies nachweisen, davon mit fast 80% führend der *Candida albicans*. Aber auch bei Proben, die in der TaqMan-PCR positiv sind, ließen sich in parallel dazu angelegten Kulturen *Candida*-Spezies nachweisen. Um zwischen zusätzlicher Erkrankung und Kolonisation unterscheiden zu können, wäre eine weitere Spezifizierung der Panfungus-PCR erforderlich. Eine Spezifitätstestung der *Aspergillus-fumigatus*-spezifischen Primer mit verschiedenen *Candida*-Spezies ist erfolgt. Da keine Amplifikation von *Candida*-DNS nachgewiesen werden konnte, ist eine Kreuzreaktion mit den getesteten *Candida*-Spezies nicht wahrscheinlich. Da die Unterscheidung zwischen *Aspergillus*- und *Candida*-Spezies in der klinischen Anwendung therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen würde, sollte eine Erweiterung des Erregerspektrums der TaqMan-PCR zum Nachweis von *Candida albicans* oder verschiedenen *Candida*-Spezies, in Betracht gezogen werden.

4.2.5 Probenmaterial

Über 83,5% der Proben entstammten dem Respirationstrakt. Darunter befanden sich 78,3% bronchoalveoläre Lavagen. Bei allen acht Patienten mit einer bewiesenen invasiven Aspergillose ließ sich *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachweisen. Darunter in sieben Bronchiallavagen, zwei Trachealsekreten und zwei Lungenbiopsaten. Der Nachweis in einem Leberbiopsat bei bewiesener disseminierter Aspergillose gelang, allerdings mit einem deutlichen Quantitätsverlust (Lungenbiopsat 563.000 Kopien versus Leberbiopsat 50 Kopien), ob dieser auf eine geringere *Aspergillus-fumigatus*-Konzentration in diesem Gewebe oder auf eine schlechtere Extrahierbarkeit des Gewebes zurückzuführen ist, lässt sich nicht klären. Weitere Leberbiopsate wurden nicht untersucht. Problematisch erscheint der Nachweis von *Aspergillus-fumigatus*-DNS im Pleurapunktat. Hier konnte in beiden Punktaten bei bewiesener disseminierter bzw. pulmonaler invasiver Aspergillose keine *Aspergillus-fumigatus*-DNS nachgewiesen werden. Das könnte einerseits mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme zusammenhängen, da diese post mortem stattfand. Die andere Möglichkeit ist die fehlende Verbreitung des *Aspergillus-fumigatus* in der Pleuraflüssigkeit. Der Nachweis einer zerebralen Aspergillose im Liquor konnte durch das hier angewendete Verfahren in der Liquoruntersuchung mit einem Wert von 520.000 Kopien bestätigt werden. Über die Zuverlässigkeit kann bei nur einer Liquorprobe eines Patienten mit bewiesener Aspergillose nicht geurteilt werden. Der Nachweis von *Aspergillus-fumigatus*-DNS aus anderen Materialien wie Hornhautabradat war möglich, kann jedoch bei ebenfalls nur einer Probe eingeschränkt bewertet werden.

4.3 Testvalidität/Resultatvalidität

Die Beurteilung der Validität der in dieser Arbeit angewendeten Methode gestaltet sich schwierig, da es sich bei der relativ großen Gruppe der Patienten mit möglicher invasiver Aspergillose um Patienten handelt, bei der man letztendlich nicht entscheiden kann, ob bei ihnen eine invasive Aspergillose vorliegt. Unter Ausschluss dieser fraglichen Gruppe kann eine diagnostische Sensitivität zu 81,3% erreicht werden. Unter zusätzlichem Ausschluss der Patientengruppe der wahrscheinlichen invasiven Aspergillose liegt eine Sensitivität von 100% vor, d. h., jede bewiesene Aspergillose wird auch als solche erkannt.

Die diagnostische Spezifität hingegen liegt bei 93,7% und ändert sich bei Einbeziehung oder Ausschluss der Gruppen der möglichen und wahrscheinlichen Aspergillosen aufgrund der stets gleichbleibenden Zahl der als gesund betrachteten Patienten nicht.

In der Literatur werden unterschiedliche Ergebnisse beschrieben [81]. Diese lassen sich aufgrund verschiedener Faktoren schwer miteinander vergleichen. Ein Punkt ist die unterschiedliche Patientenanzahl, die untersucht wurde. Ein weiterer Punkt, die Kriterien, nach denen die untersuchten Patienten ausgewählt wurden und ein weiterer entscheidender Punkt beinhaltet die Bewertung der Patienten hinsichtlich der Erkrankung an einer invasiven Aspergillose. Da die von Ascioğlu et al. [35] aufgestellten Kriterien erst seit ca. drei Jahren vorliegen, gab es vorher keine „sogenannte“ Standardeinteilung, nach der Patienten im Rahmen der klinischen Forschung eingeteilt werden konnten. Unter Berücksichtigung der genannten Faktoren werden folgende unterschiedliche Ergebnisse beschrieben: So untersuchte Tang et al. 1993 [66] mittels PCR bronchoalveoläre Lavagen von 51 Patienten auf *Aspergillus fumigatus* und *flavus*. Vier Patienten wurden nach hausinternen Kriterien in die Gruppe der bewiesenen und wahrscheinlichen, ein Patient in die Gruppe der möglichen und die übrigen in die Gruppe der nicht invasiven Aspergillose eingeteilt. Es lässt sich (unter Einbeziehung der bewiesenen und der wahrscheinlichen Aspergillose)

eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 94,4% ermitteln. Jones et al. [82] untersucht 1998 die Bronchiallavagen von 69 Patienten mittels PCR-ELISA auf *Aspergillus fumigatus*, *flavus*, *terreus* und *niger*. Zwölf Patienten werden nach hausinternen Kriterien in die Gruppe der bewiesenen und wahrscheinlichen und 57 Patienten in die Gruppe der nicht invasiven Aspergillose eingeordnet. Die Sensitivität und die Spezifität werden mit jeweils 100% angegeben. Hayette et al. [65] untersuchte 2001 mittels „nested PCR“ die bronchoalveolären Lavagen von 177 Patienten auf *Aspergillus fumigatus* und *flavus*. Die Einteilung der Patienten erfolgt in bewiesene und wahrscheinliche Aspergillose (eine Gruppe) sowie in Kolonisation (diese Patienten wurden nicht in die Berechnung einbezogen) und in keine Aspergillose. Es wurde über eine Sensitivität von 100% sowie eine Spezifität von 96% beobachtet. Buchheidt et al. [83] untersuchte 2001 mittels „nested PCR“ die Bronchiallavagen von 67 immunsupprimierten Patienten auf *Aspergillus* Spezies und kann eine Sensitivität von 100% sowie eine Spezifität von 92,6% feststellen. Dabei werden 13 Patienten in die Gruppe der bewiesenen und wahrscheinlichen Aspergillose zusammengefasst. Die übrigen Patienten gehören der Gruppe der nicht invasiven Aspergillose zu.

Zusätzlich zu beachten ist, dass wegen der geringfügigen Patientenzahlen in den Gruppen der bewiesenen und der wahrscheinlichen invasiven Aspergillose im Verhältnis zur oft weitaus größeren Gruppe der nicht an einer invasiven Aspergillose erkrankten Patienten, kleine Differenzen innerhalb der einzelnen Patientenergebnisse große Auswirkungen auf das Gesamtergebnis der diagnostischen Gütekriterien haben können. Bei Betrachtung der Literatur liegt der Wert der in der vorliegenden Arbeit festgestellten diagnostischen Sensitivität (für die bewiesene und wahrscheinliche invasive Aspergillose) von 81,3% häufig unter den angegebenen Werten.

Insgesamt wurden in der Gruppe der wahrscheinlichen Aspergillose vier falsch-negative Proben (von drei Patienten) beobachtet. Patient Nr. 16 (Tabelle 11) der Gruppe der wahrscheinlichen Aspergillose war zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits zwei Tage antimykotisch behandelt. Der Wert in der TaqMan-PCR ist negativ. In der Kultur ließ sich ein Wachstum von *Aspergillus fumigatus* feststellen. Da bei zwei anderen Patienten (Nr. 6 und Nr. 8, Tabelle 10) mit bewiesener Aspergillose rückläufige Werte bis unter den Schwellenwert nach antimykotischer Therapie beobachtet werden konnten, könnte die antimykotische Therapie den fehlenden Nachweis bei Patient Nr. 16 erklären. Bei zusätzlich klinischen Auffälligkeiten mit röntgenologischen und computertomographischen *Aspergillus*-verdächtigen Rundherden ist weder eine Kontamination der Kultur, noch eine Kolonisation wahrscheinlich. Weiter zu erwägen ist bei positiver Panfungus-PCR die (zusätzliche) Infektion mit einer anderen Pilzspezies, die mit der angelegten Kultur nicht erfasst wurde. Bei einer weiteren Patientin (Nr. 14, Tabelle 11) mit einer wahrscheinlichen invasiven Aspergillose liegt als Grunderkrankung eine chronische Granulomatose vor. In der Kultur ließ sich in einer von zwei Bronchiallavagen *Aspergillus-fumigatus*-Wachstum nachweisen. Die untersuchten Proben zeigten einen negativen TaqMan-Wert bei positiver Panfungus-PCR. Da in der Kultur zusätzlich ein Wachstum von *Candida albicans* beschrieben werden konnte, liegt der Verdacht einer zusätzlichen Infektion mit diesem Pilz nahe. Eine andere Möglichkeit ist die Kontamination der angelegten Kulturen durch aerogene *Aspergillus*-Sporen, jedoch ist diese Möglichkeit bei zusätzlich röntgenologisch *Aspergillus*-verdächtigen Auffälligkeiten fraglich. Eine weitere Erklärung könnte eine Aspergillose durch eine andere *Aspergillus*-Spezies als *Aspergillus fumigatus* sein. Der Nachweis von *Aspergillus nidulans* bei Patienten mit chronischer Granulomatose wird wiederholt beschrieben [84]. Ein durchgeführter Antigen-Test aus der Bronchiallavage und aus dem Serum für *Aspergillus fumigatus* bleibt wiederholt negativ. Verweij et al. [85] beschrieb den Fall eines Patienten mit ebenfalls chronischer Granulomatose, bei dem trotz bewiesener invasiver Aspergillose wiederholt weder *Aspergillus*-DNS noch zirkulierendes Antigen im Serum nachgewiesen werden konnte. Hier gelingt jedoch zweimal der Antigen-

Nachweis im Aspirat eines *Aspergillus*-Rundherdes. Letztendlich kann der fehlende Nachweis nicht sicher erklärt werden. Ebenfalls unklar bleibt Patient Nr. 15 (Tabelle 11), bei dem trotz *Aspergillus-fumigatus*-Wachstum in der Kultur und klinischer Erfüllung eines Wirtskriteriums und zwei Majorkriterien kein relevanter Wert in der TaqMan-PCR gemessen werden konnte. Bei positiver Pan-Fungus-PCR könnte in diesem Fall eine Kontamination der Kultur mit *Aspergillus*-Sporen, bei Erkrankung durch einen anderen fungalen Erreger vorliegen, der kulturell nicht erfasst wurde.

In der Gruppe der nicht invasiven Aspergillose beträgt die Anzahl an falsch-positiven Patienten 6,3%. In der Literatur werden wiederholt falsch-positive Befunde beschrieben. Der Anteil der falsch-positiven Befunde bei der Untersuchung von Bronchiallavagen liegt je nach Publikation bei 6,2% über 15,4% bis zu 18% [53, 83, 66]. Als Ursache werden Kolonisationen (z. B. bei zusätzlich positivem Sputum) [66], aber auch Kontaminationen vermutet [53]. Da sich die Anzahl der falsch-positiven Befunde bei den hier untersuchten Patienten auf die Risikopatienten mit einer hämatologischen Grunderkrankung beziehen, kann eine Kolonisation als Ursache für diese positiven Befunde angenommen werden.

4.4 Ausblick

Die Diagnose der invasiven Aspergillose ist, wie aus der Einleitung hervorgeht, heutzutage immer noch ein Problem. Ein Standbein in der Diagnostik werden die molekularbiologischen Methoden darstellen. Weiterhin fehlt es jedoch an standardisierten Verfahren. Zudem werden in der Bewertung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität noch deutliche Schwankungen beschrieben [65, 66, 81, 82, 83, siehe Kapitel 4.3], so dass die klinische Einsetzbarkeit beschränkt ist.

Unter den Extraktionsverfahren existieren eine Vielzahl kommerzieller und nicht kommerzieller [48, 50, 56, 61, 62, 63, 65, 66, 67] Methoden bezüglich der *Aspergillus*-Spezies, aber auch anderer Pilze. Costa [74] und Loeffler et al. [69] publizierten 2002 erfolgreich ein automatisches Extraktionsverfahren (MagNA Pure LC), mit dem 23 verschiedene Pilz-Spezies nachgewiesen werden können. Dieses könnte ein weiterer Schritt Richtung Vereinheitlichung auf kommerzieller Basis bedeuten.

Die Weiterentwicklung der PCR in Richtung der quantitativen real-time-PCR bietet hinsichtlich einer Minimierung des Kontaminationsrisikos deutliche Vorteile. Zusätzlich bietet die Quantifizierung unter anderem die Möglichkeit den Erfolg einer Therapie zu bewerten. Weitere Studien zur Anwendbarkeit in der klinischen Diagnostik sind erforderlich.

Ein anderes wichtiges diagnostisches Verfahren ist der Nachweis des Galactomannan Antigens mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Ein Vorteil dieses Verfahrens ist die kommerzielle Verfügbarkeit (*Aspergillus* Platelia) sowie die Möglichkeit standardisierter serologischer Berechnungen, die einen Vergleich mit verschiedenen Arbeitsgruppen ermöglichen. Ein Vergleich zwischen diesem Verfahren der Antigen-Bestimmung und der PCR wurde wiederholt mit unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt [46, 63, 74, 75, 86, 87, 88, 89, 90]. Die uneinheitlichen Ergebnisse sind unter anderem auf verschiedene Testbedingungen, aber auch auf das nicht standardisierte Verfahren der PCR zurückzuführen. So berichten Becker [46] und Verweij et al. [90] über eine Überlegenheit des Galactomannan-ELISA. Bretagne et al. [86] beschreibt keinen bedeutenden Unterschied beider Verfahren. Hashimoto [88], Kawamura [89] und Williamson et al. [63] hingegen berichten über eine Überlegenheit der PCR gegenüber des Nachweises von Galactomannan. Kawazu et al. [75] vergleicht 2004 den ELISA mit der

real-time-PCR und stellt eine Überlegenheit des Galaktomannan-Antigen-Nachweises fest. Dieser Vielfalt an Daten ist zu entnehmen, dass bis heute kein Verfahren isoliert als Optimum betrachtet werden kann. Vielmehr erscheint die Kombination beider Verfahren die Zuverlässigkeit der Diagnose einer invasiven Aspergillose zu erhöhen [65].

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine Methode zum schnellen und quantitativen Nachweis von *Aspergillus-fumigatus*-DNS zu etablieren. Sie basiert einerseits auf dem Extraktionsverfahren mit dem FastDNA-Kit und andererseits aus der anschließenden real-time-PCR im ABI Prism 7700 Sequence Detection System. Die Extraktionsmethode zeichnet sich durch die Kombination eines enzymatisch-mechanischen Verfahrens mittels Einsatz einer kommerziellen Lysing Matrix und Bearbeitung im FastPrep cell disrupter aus und erwies sich im Vergleich mit dem enzymatisch-chemischen Verfahren hinsichtlich der Sensitivität als überlegen (10^4 versus 10^1 KBE/ml). In der anschließenden TaqMan-PCR erfolgte die Amplifikation und Detektion der extrahierten DNS in einem Arbeitsschritt, so dass Carry-over-Kontaminationen durch häufiges Öffnen der Reaktionsgefäße minimiert wurden. Die gleichzeitige Quantifizierung der Proben erfolgte an Hand Einsatz einer Standardreihe, die zuvor aus *Aspergillus-fumigatus*-DNS mittels Klonierung, Transformation und Plasmid-Isolierung erstellt wurde. Für die Spezifizierung wurden ein Primerpaar und eine fluoreszierende Sonde über die GenDatenbank ermittelt. Die Primer wurden als spezifisch für *Aspergillus fumigatus* getestet. Durch Untersuchung von Verdünnungsreihen konnte eine Sensitivität von 10^1 KBE/ml erreicht werden. Die Durchführung des gesamten Verfahrens dauert etwa sechs Stunden, so dass ein Ergebnis innerhalb eines Arbeitstages vorliegen kann.

Die Methode wurde an Hand von 204 Patienten klinisch evaluiert. In einem Zeitraum von drei Jahren werden insgesamt 269 Proben untersucht. Dabei handelte es sich zu 83,5% um Proben aus dem Respirationstrakt, darunter befanden sich 212 bronchoalveoläre Lavagen. 167 Proben wurden von hämatologischen/onkologischen Abteilungen der Charité Berlin bezogen, 31 entstammten dem Universitäts-Klinikum Eppendorf, Hamburg. 71 Proben wurden aus der Lungenfachklinik Heckehorn bezogen und als Vergleichskollektiv betrachtet. Der Nachweis von *Aspergillus-fumigatus*-DNS gelang aus verschiedenen Materialien, darunter Bronchiallavagen, Trachealsekreten, Bronchialsekreten, Lungenbiopsaten, einem Leberbiopsat, einer Liquorprobe sowie einem Hornhautabradat. Bei zwei Patienten mit bewiesener invasiver pulmonaler und disseminierter Aspergillose gelang der Nachweis aus Pleurapunktaten nicht.

Jeder Patient wurde an Hand klinischer Daten in eine bestimmte Gruppe, entweder in die Gruppe der bewiesenen, wahrscheinlichen, möglichen oder nicht vorhandenen invasiven Aspergillose, eingeteilt. Die höchsten Werte konnten innerhalb der Gruppe der bewiesenen Aspergillose gemessen werden. Die weitere Differenzierung zwischen den anderen Gruppen gestaltete sich bei nur noch geringfügigen Unterschieden zwischen den gemessenen Werten sowie höheren Werten in Gruppen mit geringerem Risiko als schwierig. 6,3% falsch-positive Patienten in der Gruppe der nicht invasiven Aspergillose ließen an eine Kolonisation denken. Diese lässt sich nicht an Hand der Höhe des Wertes erkennen. Eine Kontamination konnte nicht ausgeschlossen werden. Die diagnostische Sensitivität beträgt unter Ausschluss der Patienten mit möglicher invasiver Aspergillose 81,3%, die Spezifität 93,7%. Der positive prädiktive Wert liegt bei 72,2%, der negative prädiktive Wert bei 96,1%.

Bei etwa 90% der Patienten wurde parallel eine Panfungus-PCR durchgeführt. Etwa jeder vierte (25,7%) in der TaqMan-PCR negative Wert, wies hier ein positives Signal auf, so dass eine Erweiterung des Keimspektrums erwogen werden sollte.

Mit der hier angewendeten Methode lässt sich schnell und zuverlässig *Aspergillus-fumigatus*-DNS aus Bronchiallavagen und Gewebeproben isolieren. Die Bewertung der Ergebnisse reicht allein jedoch nicht aus, um eine zuverlässige Diagnose zu stellen, bzw. um zwischen Kontamination und Kolonisation zu unterscheiden. Als zusätzlicher Baustein in einer umfangreicheren Gesamtdiagnostik, die für das Erkennen einer invasiven Aspergillose unerlässlich ist, kann sie einen Beitrag zur Verbesserung molekularer Nachweisverfahren leisten.

6 Reagenzienliste

Aqua ad injectabilia	Steriles Wasser (Ecotainer, Braun, Melsungen)
CLS-Y	Cell Lysis Solution for yeast, algae und fungi (BIO 101)
Dynabeads	Magnetbeads, aus DNA Direct™ Kit, Prod.Nr. 630.02 (DYNAL)
DES	DNA Elution Solution, ultra-pure water (BIO 101)
DNS-Gewichtsmarker	DNA Molecular Weight Marker VI, 1062590 (ROCHE, Mannheim)
dNTP	ATP, CTP, GTP, TTP à 2,5 mM (BRL)
EDTA	10mM (Sigma, Steinheim, Germany, No. E-5134);
Ethidium bromide	1%, 21251 (SERVA)
Ethanol	70% Ethanol (Merck, Darmstadt, Germany, No. 1.00983)
Gelladepuffer	Gel Loading Solution (SIGMA, G-2526)
Kulturbühe	Bacto,Saboraud Dextrose Broth, 0382-17-9 (Becton Dickinson, Heidelberg)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium, 950ml Aqua ad injectabilia, 10g Tryptone, 5g Yeast Extract, 10g NaCl (DIFCO, Detroit)
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid 50mM (Invitrogen, Gibco)
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid 25mM (Sigma, Taufkirchen)
Mineralöl	M-5904 (Sigma, Steinheim)
NaCl	Natrium-Chlorid, 1.06404 (1000) (Merck, Darmstadt)
NaOH	Natronlauge, Pätzchen, 50mM (6498) (Merck, Darmstadt))
N3-Puffer	100mM TRIS/H ₃ PO ₄ ; 15%Ethanol; 900mM KCl; pH 6,3 (NUCLEOBOND)
N4-Puffer	100mM TRIS/H ₃ PO ₄ ; 15%Ethanol; 1150mM KCl; pH 6,3 (NUCLEOBOND)
N5-Puffer	100mM TRIS/H ₃ PO ₄ ; 15%Ethanol; 1000mM KCl; pH 8,5 (NUCLEOBOND)
PCR-Puffer	10mM TRIS-HCl; 500mM KCl, pH 8,3; Konzentration 10x (Perkin Elmer)
pCR 2.1-TOPO vector	10ng/µl plasmid DANN (Invitrogen)
Platinum Taq-Polymerase	10x PCR-Buffer minus Mg, 50mM Magnesium Chloride (GIBCOBRL, No. 10966-034)

Proteinase K	200mg/l (Merck, Darmstadt, Germany, No. 1.24568.0500)
RCLB	Red Cell Lysis Buffer: 10mM TRIS; pH 7,6; 5mM MgCl, 10mM NaCl
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin, 150µM (TIB Molbiol)
S1-Puffer	50mM Tris/HCl, 10mM EDTA, 100µg RNase A/ml, pH 8,0 (NUCLEOBOND)
S2-Puffer	200mM NaOH, 1% SDS (NUCLEOBOND)
S3-Puffer	2.80M Kac; pH 5,1 (NUCLEOBOND)
SAB-Agar	Sabouraud-Glucose-Agar, 2% Glucose (Becton Dickinson)
SDS-Lösung	Dodecylsulfat Natriumsalz, (Merck, Darmstadt, Germany, No. 13760.0100);
SEWS-M	Salt Ethanol Wash, purification reagent (BIO 101)
Taq-Polymerase	5U/µl (Perkin Elmer)
TBE-Puffer	10x TBE-Puffer (Serva, Heidelberg, Germany, No. 42557)
TE-Puffer	pH 8; 10mM TRIS; 1mM EDTA (Invitrogen, Gibco)
TRIS	pH 7,6 (TRIS Hydroxymethylaminomethan, Merck, 1.08382)
Waschpuffer	Washing Buffer, DANN Direct™Kit, Nr. 63002 (DYNAL)
WCLB	White Cell Lysis Buffer: 10mM TRIS; pH 7,6; 10mM EDTA, 50mM NaCl; 0,2% SDS, 200mg/l Proteinase K
Zymolase	1,3-laminaripentaohydrolase von Arthrobacter luteus, ICN 320921

7 Anhang

7.1 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Ruhnke für die Überlassung des Promotionsthemas, für die organisatorische Unterstützung und für die hilfreichen und wertvollen Diskussionen in allen Phasen der Durchführung dieser Arbeit. Frau Clarissa Radecke danke ich herzlichst für die exzellente Hilfe bei der Einarbeitung in die Methodik, für die Zuarbeit mit Patientenmaterial und für die oft hilfreiche moralische Unterstützung während und nach meiner Laborarbeit. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Elstner (Charité Campus Mitte) und bei Herrn Prof. Dr. Christian Schmidt (Charité, Campus Wedding) für die Bereitstellung des TaqMan ABI Prism 7700 SDS bedanken. Herrn Joachim Hänfler danke ich für die Hilfe bei der Sondenauswahl und bei der Etablierung der TaqMan-PCR.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. Schewe, Herrn Prof. Dr. Lode, Herrn Prof. Dr. Maschmeyer und Herrn Dr. Stefan Schwartz für die Kooperation hinsichtlich der Untersuchung des Patientenmaterials.

Zusätzlicher Dank gilt allen Einsendern des Verbundprojektes „Lungeninfiltrate“ (Förderung durch die Deutsche Krebshilfe).

7.2 Konferenzbeiträge

Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 27.-30.10.2002, Onkologie, Sonderheft 4, Vol.25, Oktober 2002, S201:

Scheer C, Reinicke A, Hänfler J, Schmidt C A, Schwartz S, Ruhnke M:

Rapid Diagnostics of Aspergillosis from Bronchoalveolar Lavage Samples Using Real-time PCR

Poster P2 im Rahmen der Jahrestagung der deutschsprachigen mykologischen Gesellschaft in München am 12.-14.09.2002, Mycoses 2002 (45, Nr.7): 235:

Otto K, Scheer C, Radecke C, Ruhnke M:

Molekulare Diagnostik invasiver Aspergillosen aus Blut mit TaqMan „real time-PCR“

43. Interscience Conference on Antimicrobial Agents & Chemotherapy, Poster M-1029, Chicago 2003:

Ruhnke M, Scheer C, Otto K, Maschmeyer G, Schwartz S, Lode H:

Value of galactomannan detection (Platelia AspergillusTM) from Bronchoalveolar Lavage Samples for diagnosis of Aspergillosis

7.3 Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, die Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt zu haben. Die Arbeit stellt, auch in Teilen, keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die verwendete Literatur und die benutzten Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

Berlin, den 25.05.2005

Carola Scheer

Literaturverzeichnis

1. Denning D W: State-of-the-art clinical article: Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 1998; 26: [781-805](#).
2. Fresenius J B G W: Beitrag zur Mykologie 3. Frankfurt am Main, [1863](#); 81-82.
3. Latgé JP: *Aspergillus fumigatus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999; 12 (2): [310-350](#).
4. Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J et al.: Molecular Typing of Environmental and Patient Isolates of *Aspergillus fumigatus* from Various Hospital Settings. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998; 36 (6): [1494-1500](#).
5. Walsh TJ, Dixon DM: Nosocomial aspergillosis: environmental microbiology, hospital epidemiology, diagnosis and treatment. *European Journal of Epidemiology*, 1989; 5(2): [131-142](#).
6. Weems J J, Davis B J, Tablan O C et al.: Construction activity: an independent risk factor for invasive aspergillosis and zygomycosis in patients with hematologic malignancy. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 1987; 8(2): [71-75](#).
7. Leenders A C A P, van Belkum A, Behrendt M et al.: Density and Molecular Epidemiology of *Aspergillus* in Air and Relationship to Outbreaks of *Aspergillus* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999; 37 (6): [1752-1757](#).
8. Curtis L, Cali S, Conroy L et al.: *Aspergillus* surveillance project at a large tertiary-care hospital. *Journal of Hospital Infection*, 2005; 59: [188-196](#).
9. Patterson T F, Kirkpatrick W R, White M et al.: Invasive Aspergillosis, Disease Spectrum, Treatment Practices and Outcomes. *MEDICINE*, 2000; 79 (4): [250-260](#).
10. Dixon, D M, McNeil M M, Cohen M L et al.: Fungal infections: a growing threat. *Public Health Reports*, 1996; 3 (111): [226-235](#).
11. Wanke B, Santos Lazéra M dos, Nucci M: Fungal infections in the immunocompromised Host. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2000; 95 (Supl. I): [153-158](#).
12. Stevens D A, Kan V L, Judson M A et al.: Practice Guidelines for Diseases Caused by *Aspergillus*. *Clinical Infectious Diseases*, Society of America, 2000; 30: [696-709](#).
13. Van't Hek L G, Verweij P E, Weemaes C M et al.: Successful Treatment with Voriconazol of Invasive Aspergillosis in Chronic Granulomatous Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998; 157: [1694-1696](#).

-
14. Mouy R, Fischer A, Vilmer E et al.: Incidence, severity, and prevention of infections in chronic granulomatous disease. *Journal of Pediatrics*, 1989; 114: 555-560.
 15. Kirsten D, Rieger U, Amthor M, Magnussen H: Invasive aspergillosis in cavitary lung sarcoidosis. *Pneumologie*, 1992; 46 (6): 239-242.
 16. Kemper C A, Hostetler J S, Follansbee S E et al.: Ulcerative and plaquelike tracheobronchitis due to infection with *Aspergillus* in patients with AIDS. *Clinical Infectious Diseases*, 1993; 17: 344-352.
 17. Solé A, Morant P, Salavert M et al.: *Aspergillus* infections in lung transplant recipients: risk factors and outcome. *Clinical Microbiology & Infection*, 2005; 11 (5): 359-365.
 18. Kramer M R, Denning D W, Marshall S E et al.: Ulcerative tracheobronchitis following lung transplantation: a new form of invasive aspergillosis. *American Review of Respiratory Disease*, 1991; 144: 522-526.
 19. Drakos P E, Nagler A, Or R et al.: Invasive fungal sinusitis in patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 1993; 12 (3): 203-208.
 20. Polzehl D, weschta m, Podbielski A et al.: Fungus culture and PCR in nasal lavage samples of patients with chronic rhinosinusitis. *Journal of Medical Microbiology*, 2005; 54: 31-37.
 21. Denning D W: Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 1996; 23: 608-615.
 22. Groll A H, Shah P M, Mentzel et al.: Trends in the Postmortem Epidemiology of Invasive Fungal Infections at a university hospital. *Journal of Infection*, 1996; 33 (1): 23-32.
 23. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA: Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *Journal of Infectious Diseases*, 1997; 175 (6): 1459-1466.
 24. Hunter A, Haynes A, Russell N: Bone marrow transplantation: current situation, complications and prevention. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1995; 36 (Suppl. B): 119-133.
 25. Fishman, J A, Rubin R H: Infection in Organ-Transplant Recipients. *The New England Journal of Medicine* 1998; 338: 1741-1751.
 26. Bow E J, Loewen R, Cheang M S, Schacter B: Invasive fungal disease in adults undergoing remission-induction therapy for acute myeloid leukemia: the pathogenetic role of the antileukemic regimen. *Clinical Infectious Diseases*, 1995; 21(2): 361-369.

-
27. Einsele H, Quabeck K, Muller K D et al.: Prediction of invasive pulmonary aspergillosis from colonisation of lower respiratory tract before marrow transplantation. *Lancet*, [1998](#); 352 (9138): [1443](#).
 28. Von Eiff M, Roos N, Schulten R et al.: Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration*, [1995](#); 62 (6): [341-347](#).
 29. Aisner J, Wiernik P H, Schimpff S C: Treatment of invasive aspergillosis: relation of early diagnosis and treatment to response. *Annals of Internal Medicine*, [1977](#); 86 (6): [539-543](#).
 30. Kontoyiannis D P, Bodey G P: Invasive Aspergillosis in 2002: an update. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, [2002](#); 21 (3): [161-172](#).
 31. Caillot D, Casanovas O, Bernard A et al.: Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *Journal of Clinical Oncology*, [1997](#); 15: [139-147](#).
 32. Maschmeyer G, Link H, Hiddemann W et al.: Pulmonary Infiltrations in Febrile Patients with Neutropenia. *Cancer*, [1994](#); 73 (9):[2296-2304](#).
 33. Diederich S, Scadeng M, Dennis C et al.: Aspergillus infection of the respiratory tract after lung transplantation: chest radiographic and CT findings. *Eur. Radiol*, [1998](#); 8 (2): [306-312](#).
 34. Heussel C P, Ullmann A J, Kauczor HU: Pilzpneumonie. *Radiologe*, [2000](#); 40: [518-529](#).
 35. Ascioglu S, Rex J H, de Pauw B et al.: Definig Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. *Clinical Infectious Diseases*, [2002](#); 34: [7-14](#).
 36. Seyfahrt HJ, Nenoff P, Winkler J et al.: Invasive Pulmonale Aspergillose – CT-Befunde im Kontext des klinischen Verlaufes. *Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*, [2002](#); 174: [1115-1120](#).
 37. Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H et al.: Polymerase Chain Reaction Detection of Aspergillus DNA in Experimental Models of Invasive Aspergillosis. *The Journal of Infectious Diseases*, [2002](#); 185: [1203-1206](#).
 38. Rimek D, Garg A P, Kappe R, Sonntag H G: Pilz-Nukleinsäure-Nachweis bei invasiven Aspergillosen. *Mycoses* [1998](#); 41 (Suppl.2): [65-68](#).
 39. Einsele H, Bertz H, Beyer J et al.: Epidemiologie und interventionelle Therapiestrategien infektiöser Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, [2001](#); [1278-1284](#).

-
40. Reimer L G, Wilson M L, Weinstein M P: Update on Detection of Bacteremia and Fungemia. *Clinical Microbiology Reviews*, [1997](#); 10 (3): [444-465](#).
 41. Maertens J, Verhaegen J, Demuynck H et al.: Autopsy-Controlled Prospective Evaluation of Serial Screening for Circulating Galactomannan by a Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Hematological Patients at Risk for Invasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, [1999](#); 37 (10): [3223-3228](#).
 42. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L et al.: Comparison of Real-Time PCR, Conventional PCR, and Galactomannan Antigen Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Hematology Patients for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, [2003](#); 41 (8): [3922-3925](#).
 43. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K et al.: Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood*, [2001](#); 97: [1604-1610](#).
 44. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C et al.: Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Oncology*, [2002](#); 20 (7): [1898-1906](#).
 45. Musher B, Fredricks D, Leisenring W et al.: Aspergillus Galactomannan Enzyme Immunoassay and Quantitative PCR for Diagnosis of Invasive Aspergillosis with Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, [2004](#); 42 (12): [5517-5522](#).
 46. Becker M J, de Marie S, Willemse D et al.: Quantitative Galactomannan Detection Is Superior to PCR in Diagnosing and Monitoring Invasive Pulmonary Aspergillosis in an Experimental Rat Model. *Journal of Clinical Microbiology*, [2000](#); 38 (4): [1434-1438](#).
 47. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise R W et al.: Panfungal PCR Assay for Detection of Fungal Infection in Human Blood Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, [1998](#); 36 (5): [1169-1175](#).
 48. Hopfer R L, Walden P, Setterquist S, Highsmith W E: Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, [1993](#); 31: [65-75](#).
 49. Makimura K, Murayama S Y, Yamaguchi H: Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Microbiology*, [1994](#); 40: [358-364](#).
 50. Sandhu G S, Kline B C, Stockmann L, Roberts G D: Molecular Probes for Diagnosis of Fungal Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, [1995](#); 33 (11): [2913-2919](#).
 51. Melchers W J G, Verweij P E, van den Hurk P et al.: General Primer-Mediated PCR for Detection of Aspergillus Species. *Journal of Clinical Microbiology*, [1994](#); 32 (7): [1710-1717](#).

-
52. Reddy L V, Kumar A, Kurup V P: Specific amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, [1993](#); 7: [121-126](#).
 53. Skladny H, Buchheidt D, Baust C et al.: Specific Detection of *Aspergillus* Species in Blood and Bronchoalveolar Lavage Samples of Immunocompromised Patients by Two-Step PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, [1999](#); 37 (12): [3865-3871](#).
 54. Lee L G, Connell C R, Bloch W: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research*, [1993](#); 21 (16): [3761-3766](#).
 55. Loeffler J, Hebart H, Schumacher U et al.: Comparison of Different Methods for Extraction of DNA of Fungal Pathogens from Cultures and Blood. *Journal of Clinical Microbiology*, [1997](#); 35 (12): [3311-3312](#).
 56. Müller FM C, Werner K E, Kasai M et al.: Rapid Extraction of Genomic DNA from Medically Important Yeasts and Filamentous Fungi by High-Speed Cell Disruption. *Journal of Clinical Microbiology*, [1998](#); 36 (6): [1625-1629](#).
 57. Förster V T: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics*, [1948](#); 2: [55-75](#).
 58. Livak K J, Flood S J A, Marmaro J et al.: Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *PCR Methods and Applications*, [1995](#); 4: [357-367](#).
 59. Schild T A: Einführung in die Realtime-TaqMan-PCR-Technologie; [1996](#): [1-39](#).
 60. Subirà M, Martino R, Rovira M et al.: Clinical applicability of the new EORTC/MSG classification for invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and autopsy-confirmed invasive aspergillosis. *Ann Hematology*, [2003](#); 82: [80-82](#).
 61. Haynes K, Westerneng T, Fell J, Moens W: Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *Journal of Medical Veterinary Mycology*, [1996](#); 33: [319-325](#).
 62. Einsele H, Hebart H, Roller G et al.: Detection and Identification of Fungal Pathogens in Blood by Using Molecular Probes. *Journal of Clinical Microbiology*, [1997](#); 35 (6): [1353-1360](#).
 63. Williamson E C M, Leeming J P, Palmer H M et al.: Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. *British Journal of Haematology*, [2000](#); 108: [132-139](#).
 64. Loeffler J, Hebart H, Bialek R et al.: Contaminations Occurring in Fungal PCR Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, [1999](#); 37 (4): [1200-1202](#).

-
65. Hayette MP, Vaira D, Susin F et al.: Detection of Aspergillus Species DNA by PCR in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001; 38 (6): 2338-2340.
 66. Tang C M, Holden D, Aufauvre-Brown A, Cohen J: The Detection of Aspergillus spp. By the Polymerase Chain Reaction and Its Evaluation in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *American Review of Respiratory Disease*, 1993; 148: 1313-1317.
 67. Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M: PCR Detection of DNA Specific for Aspergillus Species i Serum of Patients with Invasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996; 34 (10): 2464-2468.
 68. Loeffler J, Henke N, Hebart H et al.: Quantification of Fungal DNA by Using Fluorescence Resonance Energy Transfer and the Light Cycler System. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000; 38 (2): 586-590.
 69. Loeffler J, Schmidt K, Hebart H et al.: Automated Extraction of Genomic DANN from Medically Important Yeast Spezies and Filamentous Fungi by Using the MagNA Pure LC System. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40 (6): 2240-2243.
 70. Bowman J C, Abruzzo G K, Anderson J W et al.: Quantitative PCR Assay To Measure Aspergillus fumigatus Burden in a Murine Model of Disseminated Aspergillosis: Demonstration of Efficacy of Caspofungin Acetate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001; 45 (12): 3474-3481.
 71. Bu R, Sathiapalan R K, Ibrahim M M et al.: Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of Candida and Aspergillus. *Journal of Medical Microbiology*, 2005; 54: 243-248.
 72. Challier S, Boyer S, Abachin E, Berche P: Development of a Serum-Based TaqMan Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; 42 (2): 844-846.
 73. Costa C, Vidaud D, Olivi M et al.: Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating Aspergillus fumigatus DNA in serum. *Journal of Microbiological Methods*, 2001; 44: 263-269.
 74. Costa C, Costa JM, Desterke C et al.: Real-Time PCR Coupled with Automated DNA Extraktion and Detection of Galactomannan Antigen in Serum by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of invasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40 (6): 2224-2227.
 75. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y et al.: Prospective Comparison of the Diagnostic Potential of Real-Time PCR, Double-Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Galactomannan,

-
- and a (1→3)-β-D-Glucan Test in Weekly Screening for Invasive Aspergillosis in Patients with Hematological Disorders. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; 42 (6): 2733-2741.
76. Rantakokko-Jalava K, Laaksonen S, Issakainen J et al.: Semiquantitative Detection by Real-Time PCR of *Aspergillus fumigatus* in Bronchoalveolar Lavage Fluids and Tissue Biopsy Specimens from Patients with Invasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003; 41 (9): 4304-4311.
77. Pryce T M, Kay I D, Palldino S, Heath C H: Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003; 47: 487-496.
78. Brandt M E, Padhye A A, Mayer L W et al.: Utility of Random Amplified Polymorphic DNA PCR and TaqMan Automated Detection in Molecular Identification of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998; 36 (7): 2057-2062.
79. Spiess B, Buchheidt D, Baust C et al.: Development of a LightCycler PCR Assay for Detection and Quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in Clinical Samples from Neutropenic Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003; 41 (5): 1811-1818.
80. Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A et al.: Detection of *Aspergillus fumigatus* by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993; 31 (3): 615-621.
81. Buchheidt D, Hummel M, Schleiermacher D et al.: Current Molecular Diagnostic Approaches to Systemic Infections with *Aspergillus* Species in Patients with Hematological Malignancies. *Leukemia & Lymphoma*, 2004; 45 (3): 463-468.
82. Jones M E, Fox A J, Barnes A J et al.: PCR-Elisa for the early diagnosis of invasive pulmonary aspergillus infection in neutropenic patients. *Journal of Clinical Pathology*, 1998; 51: 652-656.
83. Buchheidt D, Baust C, Skladny H et al.: Detection of *Aspergillus* Species in Blood and Bronchoalveolar Lavage Samples from Immunocompromised Patients by Means of 2-Step Polymerase Chain Reaction: Clinical Results. *Clinical Infectious Diseases*, 2001; 33: 428-435.
84. Segal B H, DeCarlo E S, Kwon-Chung K J et al.: *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*, 1998; 77 (5): 345-354.
85. Verweij P E, Weemaes C M, Curfs J H A J et al.: Failure To Detect Circulating *Aspergillus* Markers in a Patient with Chronic Granulomatous Disease and Invasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000; 38 (10): 3900-3901.
86. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E et al.: Comparison of Serum Galactomannan Antigen Detection and Competitive Polymerase Chain Reaction for Diagnosing Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 1998; 26: 1407-1412.

-
87. Buchheidt D, Hummel M, Schleiermacher D et al.: Prospective clinical evaluation of a LightCyclerTM-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *British Journal of Haematology*; 125: [196-202](#).
 88. Hashimoto A, Yamakami Y, Kamberi P et al.: Comparison of PCR, (1→3)-β-D-Glucan and Galactomannan Assays in Sera of Rats With Experimental Invasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1998; 12: [257-262](#).
 89. Kawamura S, Maesaki S, Noda T et al.: Comparison between PCR and detection of antigen in sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999; 37: [218-220](#).
 90. Verweij P E, Latgé JP, Rijs A J M M et al.: Comparison of Antigen Detection and PCR Assay Using Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosing Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients Receiving Treatment for Hematological Malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995; 33 (12): [3150-3153](#).